P. 260

MÉMOIRES
DU
MUSÉUM NATIONAL
D'HISTOIRE NATURELLE

Série D, Sciences physico-chimiques

TOME III

FASCICULE 2

Claude HÉLÈNE
Attaché de Recherche au C.N.R.S.

SPECTROSCOPIE ET PHOTOCHIMIE DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES. ROLE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES.

PARIS
ÉDITIONS DU MUSÉUM
38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire (V°)

1966

DU MUSÉUM

P. 260 c4

MÉMOIRES

DU

MUSÉUM NATIONAL

D'HISTOIRE NATURELLE

NOUVELLE SÉRIE

Série D, Sciences physico-chimiques

TOME III

FASCICULE 2

PARIS
ÉDITIONS DU MUSÉUM
36, rue Geoffroy-Saint-Hilaire (V^e^)

1966

BIBL. DU MUSEUM D'HIST. NATUR.

Source . MNHN, Paris

Source . MNHN, Paris

MÉMOIRES DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

Série D, tome III, fasc. 2.

SPECTROSCOPIE ET PHOTOCHIMIE DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES. ROLE DES INTERACTIONS MOLÉCULAIRES.

par

C. HÉLÈNE

Attaché de Recherche au C.N.R.S.

AVANT-PROPOS

Ce travail a été réalisé au laboratoire de Biophysique du Muséum National d'Histoire Naturelle. Je prie Monsieur le Professeur Charles SADRON, Directeur de ce laboratoire, de bien vouloir accepter l'expression de ma respectueuse reconnaissance pour l'accueil qu'il m'a réservé, pour les moyens qu'il a mis à ma disposition et pour l'intérêt qu'il a manifesté pour le présent sujet.

Je suis extrêmement reconnaissant à Monsieur le Professeur F. PERRIN de s'être vivement intéressé à ce travail et d'avoir accepté de présider le jury de thèse. Je remercie également Monsieur le Professeur J. TONNELAT et Monsieur le Professeur J. BARRIOL qui ont bien voulu s'intéresser à cette thèse et qui ont accepté de faire partie du jury.

Je suis heureux de pouvoir témoigner ma profonde gratitude à Monsieur Pierre DOUZOU qui a initié et guidé mes recherches. Sa bienveillante compréhension, dans des situations matérielles parfois délicates, m'a permis de poursuivre ce travail. Qu'il en soit à nouveau remercié.

Je remercie très vivement de leur généreuse collaboration Monsieur A. M. MICHELSON et son équipe (F. POCHON, A. FAVRE) ainsi que J. L. RIVAIL, qui ont synthétisé les composés sans lesquels ce travail n'aurait pu être réalisé.

Je remercie M. PTAK pour les nombreuses et fructueuses discussions que nous avons pu avoir et pour les conseils prodigués au cours de la rédaction.

Que tous mes camarades du laboratoire de Biophysique : C. ROPARS, R. SANTUS, J. M. LHOSTE, R. GUERMONPREZ et J. P. BIDEGARAY soient remerciés pour l'ambiance amicale qu'ils ont su y faire régner et pour leur aide efficace.

Je tiens enfin à associer à ces remerciements tout le personnel de ce laboratoire et plus particulièrement Mlle AUBERT et M. R. MOUTIER, ainsi que le personnel des laboratoires de physique-chimie de l'École Normale Supérieure de Saint-Cloud, qui m'ont apporté une aide précieuse, en particulier au cours de la rédaction de ce travail.

Source : MNHN, Paris

Source . MNHN, Paris

INTRODUCTION

Les acides nucléiques jouent un rôle primordial comme porteur d'information dans la synthèse des protéines et dans l'hérédité. La compréhension du mécanisme de transfert de cette information exige une connaissance détaillée de leurs structures.

Rappelons brièvement que les acides nucléiques sont des polymères linéaires formés de nucléotides (structure primaire). Chaque nucléotide est composé d'une base hétérocyclique azotée, d'une molécule de sucre [2-désoxyribose pour l'acide désoxyribonucléique (ADN), ribose pour l'acide ribonucléique (ARN)] et d'un groupement phosphate. Les bases sont, soit des dérivés de la purine (adénine et guanine), soit des dérivés de la pyrimidine (cytosine et uracile dans l'ARN, cytosine et thymine dans l'ADN). Les nucléotides sont unis entre eux par des liaisons 3′, 5′-phosphodiester. Dans certains acides nucléiques, on rencontre des bases différentes de celles citées plus haut. Ce sont essentiellement des dérivés substitués de celles-ci : par exemple, la cytosine peut être remplacée par la 5-méthylcytosine (5 % dans l'ADN des mammifères et jusqu'à 30 % dans l'ADN des plantes), par la 5-hydroxy-méthylcytosine (dans l'ADN des bactériophages T); la 6-méthylaminopurine peut également remplacer l'adénine. Les données analytiques de Chargaff (1) et les données spectroscopiques de Wilkins (2) et Franklin (3) ont permis de proposer un modèle de structure (structure primaire et secondaire). Le modèle classique proposé par Watson et Crick (4) pour l'acide désoxyribonucléique est une structure en double hélice. Le sucre et les liaisons phosphodiesters constituant l'ossature de chaque hélice sont à l'extérieur. Les bases sont situées à l'intérieur de l'hélice et sont appariées au moyen de liaisons hydrogène (fig. 1). Les seules paires possibles sont adénine-thymine et guanine-cytosine. Il y a complémentarité : le contenu en adénine est égal à celui en thymine, le contenu en guanine égal à celui en cytosine.

Le rapport $\frac{\text{adénine} + \text{thymine}}{\text{guanine} + \text{cytosine}}$ est spécifique de l'organisme auquel appartient l'ADN, mais adénine + cytosine = guanine + thymine, quel que soit cet organisme.

L'étude des diagrammes de diffusion des rayons X (2) a confirmé cette structure en double hélice et permis de distinguer pour l'ADN trois types de structures suivant la nature des cations et la teneur en eau.

Quant à la structure des acides ribonucléiques, on possède à son sujet beaucoup moins d'informations. D'ailleurs, il existe un grand nombre de types d'ARN (viral, ribosomal, soluble, messager) dont la composition et la structure sont différentes. Souvent l'ARN se présente sous la forme d'une pelote statistique contractée par la présence de zones en double hélice. Le contenu en guanine n'est pas égal à celui en cytosine, celui en adénine n'est pas égal à celui en uracile.

Source : MNHN, Paris

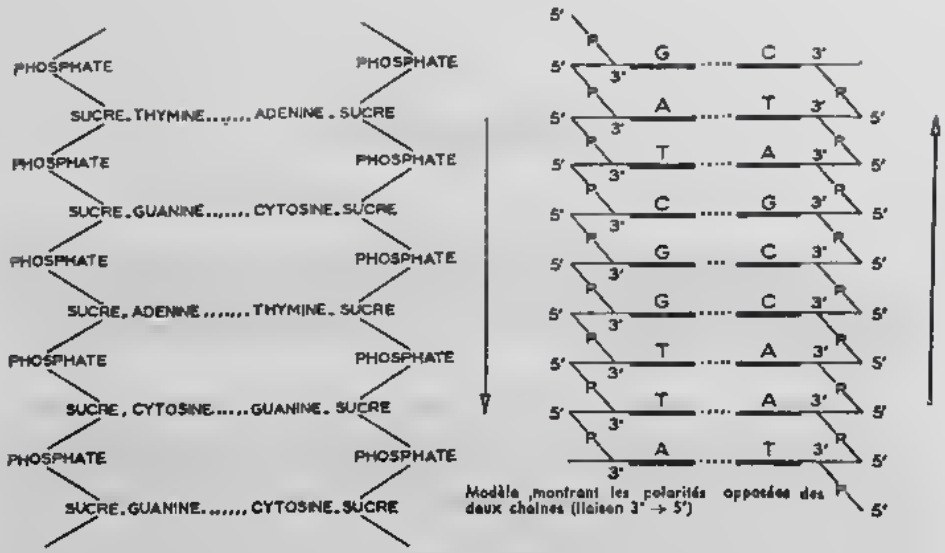


FIG. 1 *a*. — Modèles de la double hélice d'ADN.

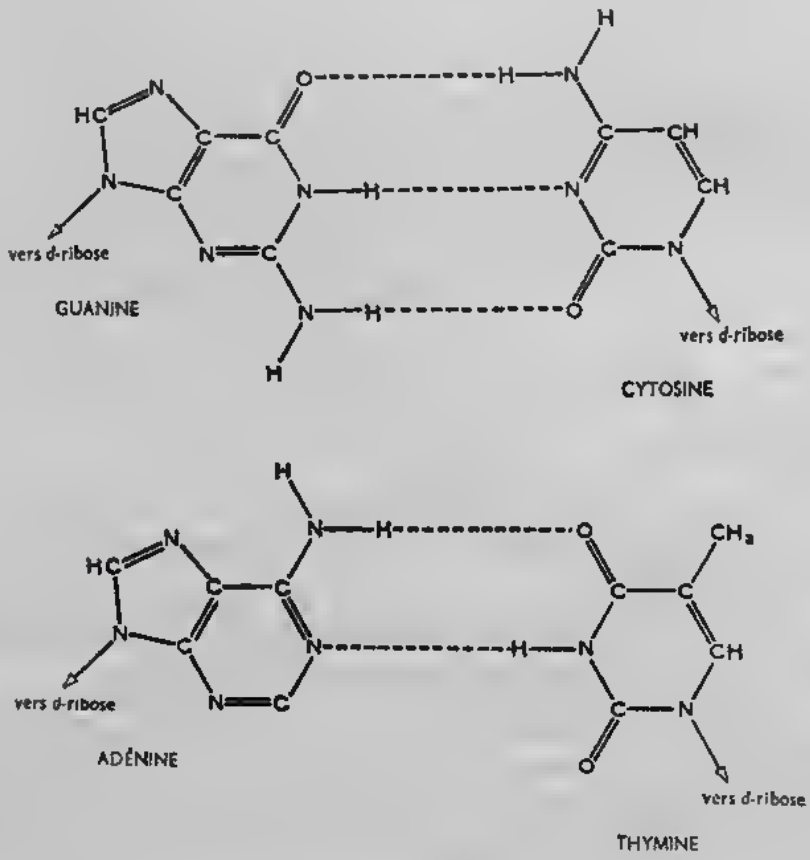


FIG. 1 *b*. — Appariement des bases dans l'ADN.

Source . MNHN, Paris

Le facteur essentiel de l'activité des acides nucléiques réside sans aucun doute dans la distribution et les interactions des différents motifs qui les constituent (4) (5). Beaucoup de propriétés physiques dues à l'existence de ces interactions et à la structure secondaire des acides nucléiques (hypochromie, pouvoir optique rotatoire) ne sont pas l'apanage des acides nucléiques de grande masse moléculaire. On les retrouve pour des polynucléotides de faible masse moléculaire et même au niveau des dinucléotides. La structure secondaire des oligonucléotides est due essentiellement aux interactions entre les bases superposées et non à la formation de liaisons hydrogène (25). Les liaisons hydrogène n'apparaissent qu'à un degré d'organisation supérieur, par exemple entre chaînes hélicoïdales de polynucléotides synthétiques ou dans l'acide désoxyribonucléique et certaines parties des acides ribonucléiques.

Parmi les facteurs qui contribuent à la stabilité de la structure secondaire des oligonucléotides, on a surtout envisagé et calculé la contribution des forces de Van der Waals-London (interactions dipôle-dipôle, dipôle-dipôle induit, forces de dispersion). Il nous a donc paru intéressant de rechercher des preuves expérimentales de l'existence de forces d'échange électronique dues au recouvrement des nuages électroniques des bases superposées et entraînant des propriétés spectroscopiques et photochimiques caractéristiques.

Les polynucléotides, en hélices simple ou double, pouvant être considérés comme des cristaux linéaires périodiques (comme dans les copolymères alternés) ou apériodiques (comme pour les ADN naturels), on peut essayer de leur appliquer les lois établies par l'étude des cristaux moléculaires organiques. La nature des interactions peut ainsi être abordée, tant du point de vue expérimental que du point de vue théorique, par l'étude des lois relatives à l'absorption d'énergie déterminant une transition électronique (sous l'action de radiations du proche ultra-violet) et à l'utilisation de cette énergie par la macromolécule : désactivation, radiative ou non radiative, vers l'état fondamental ou un état « transitoire », transfert de l'énergie absorbée et transformations photochimiques localisées.

Il nous a paru nécessaire, avant d'aborder l'étude des acides nucléiques, de porter notre attention sur les oligonucléotides dont la structure secondaire est analogue. De plus, pour que des expériences de transfert d'énergie soient facilement interprétables, notre choix s'est porté tout naturellement sur les composés modèles que sont les dinucléotides.

Le plan de notre travail sera donc le suivant :

— Le chapitre I sera consacré au rappel des concepts et des types d'expression spectroscopique établis ces dernières années par l'étude des molécules organiques dans les différents modes d'association qu'elles peuvent admettre. L'état polymère qui est celui des ensembles macromoléculaires et submicroscopiques de la matière vivante n'a été qu'effleuré jusqu'ici. On conçoit alors que, préalablement à toute anticipation, il est nécessaire d'expérimenter les constituants et les embryons naturels d'association de ces ensembles, et en particulier des acides nucléiques.

— Le chapitre II sera un examen des techniques et des problèmes qu'il a fallu résoudre pour les adapter à nos objectifs et à nos échantillons.

Source : MNHN, Paris

— Les résultats relatifs au comportement électronique des bases, des nucléosides et de quelques dérivés substitués constitueront le chapitre III. En particulier seront précisées la position relative et la nature des différents niveaux d'énergie électronique de ces molécules. L'attention sera portée particulièrement sur leur état triplet.

— Le chapitre IV montrera l'effet des interactions entre les constituants sur leur comportement spectroscopique. En particulier, deux types de transfert de l'énergie d'excitation optique seront mis en évidence dans les dinucléotides (transfert excitonique et transfert triplet-triplet).

— Enfin les conséquences photochimiques d'une excitation optique seront envisagées au chapitre V, compte tenu du transfert d'énergie entre les différents motifs interagissants.

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE PREMIER

INFLUENCE DES INTERACTIONS SUR L'UTILISATION DE L'ÉNERGIE D'EXCITATION OPTIQUE PAR UNE MOLÉCULE ORGANIQUE

A. — EXCITATION ÉLECTRONIQUE D'UNE MOLÉCULE

La structure électronique d'une molécule peut se décrire à l'aide des orbitales moléculaires. Les électrons sont groupés par paire et à chaque paire correspond une orbitale moléculaire d'énergie bien définie. Dans chaque orbitale moléculaire, les électrons ont des spins opposés (principe de Pauli). Les orbitales sont occupées dans le sens des énergies croissantes. Quand plusieurs orbitales correspondent à la même énergie, les électrons se répartissent de façon à occuper le maximum d'orbitales et à avoir des spins de même sens dans les orbitales non doublement occupées (règles de HUND).

Si s est le nombre quantique de spin, la multiplicité d'un état est égale à $2s + 1$. L'état fondamental de la plupart des molécules est un état singulet ($s = 0$). Quelques molécules (par exemple O_2) possèdent un état triplet fondamental ($s = 1$).

Un état excité résulte du passage d'un électron d'une orbitale à une orbitale d'énergie supérieure. Les deux électrons peuvent :

— soit conserver des spins de sens contraires : on a alors un état singulet S ($s = 0$; $2s + 1 = 1$).

— soit avoir des spins parallèles : on a alors un état triplet T ($s = 1$; $2s + 1 = 3$), triplement dégénéré en l'absence d'interactions magnétiques. Cette dégénérescence peut être levée sous l'influence de deux facteurs :

1° l'interaction mutuelle dipolaire des spins des deux électrons;

2° l'interaction des électrons avec un champ magnétique extérieur.

L'énergie d'un état triplet est toujours plus faible que celle de l'état singulet correspondant (règles de Hund).

On peut effectuer sur chaque orbitale moléculaire et sur chaque fonction d'onde représentative un certain nombre d'opérations de symétrie. Les différentes combinaisons possibles des opérations de symétrie pour une molécule forment un groupe de symétrie. Le groupe est caractérisé par sa table de multiplication et ne peut contenir que des représentations

Source : MNHN, Paris

irréductibles. Comme toutes les opérations de symétrie laissent inchangé le centre de gravité des molécules considérées, les groupes de symétrie sont appelés groupes ponctuels.

Sur le schéma de la figure I-1, chaque ligne horizontale forte représente un niveau d'énergie électronique de la molécule considérée avec les niveaux vibrationnels correspondants (en traits plus fins). A côté de chaque niveau d'énergie électronique, les cases figurent schématiquement les orbitales moléculaires, l'énergie allant en croissant à partir du bas. La première case à partir du bas est la plus haute orbitale occupée de l'état fondamental S_0. Les spins des deux électrons de plus haute énergie sont représentés par des flèches.

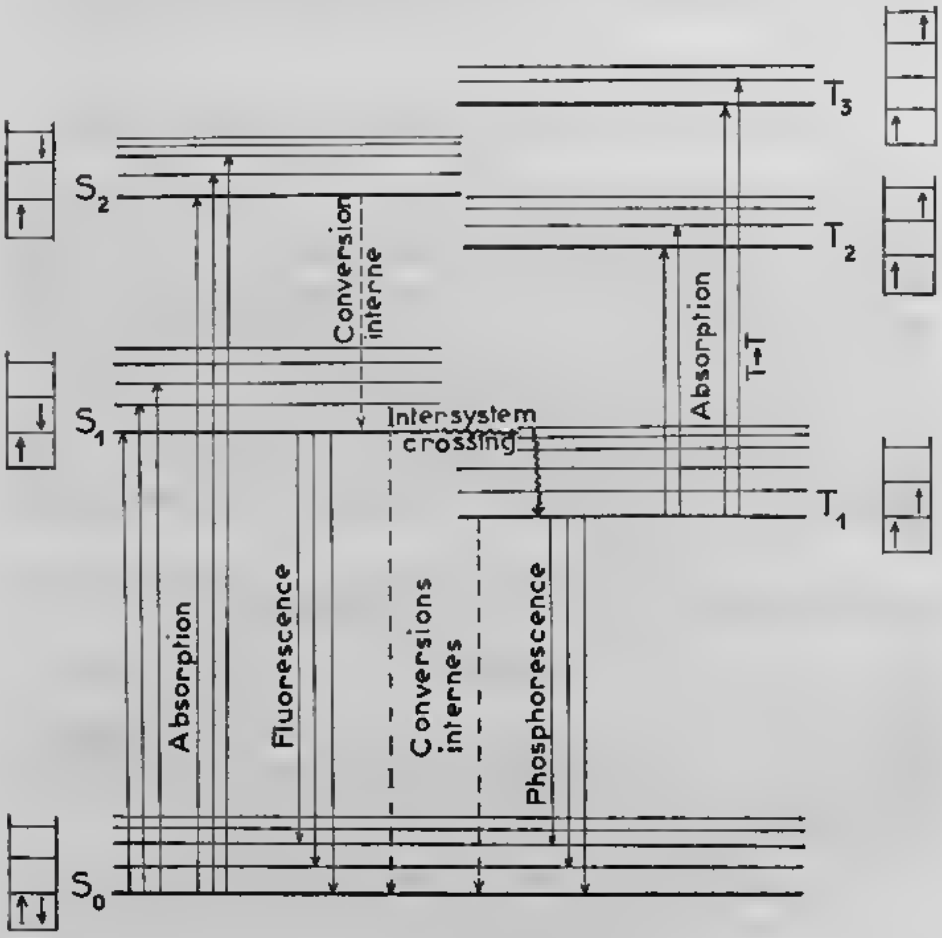


FIG. I-1. — Schéma des transitions électroniques.

1° Probabilité de transition.

L'absorption de radiations visibles ou ultraviolettes par une molécule correspond au passage d'un électron d'une orbitale à une orbitale de plus

Source : MNHN, Paris

haute énergie. La théorie quantique donne pour la probabilité de transition P une expression de la forme (6) :

$$P \propto \left[\int_{-\infty}^{+\infty} \Psi_i^* \mathcal{M} \Psi_f \, d\tau \right]^2 \qquad (1)$$

L'intégrale de l'expression (1) est appelée intégrale moment de transition M. Ψ_i et Ψ_f sont les fonctions d'onde totales de l'état initial *i* et de l'état excité *f*. $\mathcal{M}$ est l'opérateur moment dipolaire électrique. Expérimentalement la probabilité de transition, ou force oscillatoire, peut être mesurée par l'aire de la bande d'absorption correspondante. La force oscillatoire f d'une transition est donnée numériquement par la relation :

$$f = 4{,}319.10^{-9} \int \varepsilon \cdot d\bar{\nu} \qquad (2)$$

ε est le coefficient d'extinction

$\bar{\nu}$ le nombre d'ondes en cm^{-1}

f est liée au moment de transition M par la relation :

$$f = 4{,}704.10^{29} \, \bar{\nu} \cdot M^2$$

($\bar{\nu}$ en cm^{-1}; M en u.e.s. C.G.S.).

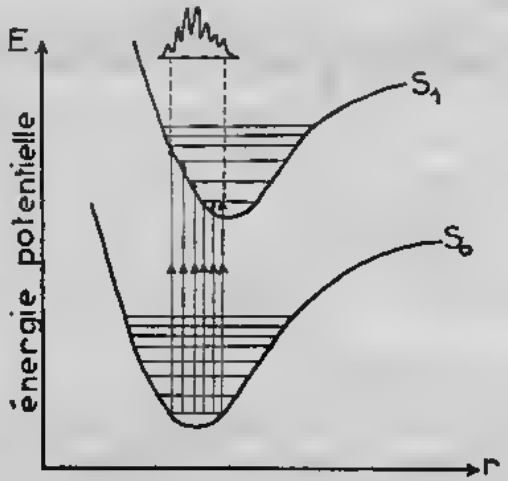


FIG. I-2. — Principe de Franck-Condon.

Les transitions électroniques se produisent sans qu'il y ait changement dans la position des atomes de la molécule (principe de Franck-Condon). Dans un état électronique excité, la répartition des atomes à l'équilibre est différente de celle de l'état fondamental (puisque les distributions électroniques sont différentes). Toute excitation électronique s'accompagne d'une excitation vibrationnelle (figure I-2).

Source . MNHN, Paris

2° Règles de sélection.

Les fonctions d'ondes électroniques Ψ_i et Ψ_f peuvent être mises sous la forme d'un produit des fonctions d'ondes d'orbitales et de spin (les fonctions d'ondes de vibration et de rotation sont négligées).

L'intégrale de l'expression (1) se sépare alors en deux intégrales. Si la multiplicité des deux états est la même, l'intégrale correspondant aux fonctions d'onde de spin est égale à 1, mais si la multiplicité est différente, cette intégrale est nulle et la transition est interdite. C'est le cas des transitions singulet → triplet pour lesquelles la probabilité de transition est extrêmement faible (environ 10^6 fois plus faible que pour les transitions singulet-singulet correspondantes).

L'intégrale correspondant aux fonctions d'onde orbitales est faible si les fonctions d'onde électroniques ont un recouvrement spatial faible. Mais elle peut également avoir une valeur faible, même dans le cas où le recouvrement spatial est important, si les symétries des deux états (fondamental et excité) sont différentes. Cependant la symétrie des différents états électroniques peut être suffisamment modifiée par les mouvements vibrationnels (couplage vibronique) pour que l'intégrale ne s'annule pas (exemple : bande à 2.640 Å du benzène).

Deux types essentiels de transitions singulet-singulet sont à envisager dans le proche ultraviolet (1800 – 4000 Å) dans le cas des bases et des nucléosides.

1) les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ qui correspondent au passage d'un électron d'une orbitale moléculaire π liante à une orbitale π^* antiliante. Ces transitions ont généralement une grande probabilité (ε de l'ordre de 10 000).

2) les transitions $n \rightarrow \pi^*$ qui impliquent le passage d'un électron d'une orbitale non liante n à une orbitale antiliante π^*. Ces transitions se rencontrent lorsque la molécule possède des atomes ayant des doublets électroniques libres (oxygène d'un groupement carbonyle, azote d'un hétérocycle azoté, par exemple). Généralement ces transitions ont une probabilité assez faible ($\varepsilon \simeq 100$) (interdites par les régles de symétrie) et conduisent à des bandes d'absorption ayant une structure vibrationnelle marquée.

3° Polarisation des transitions.

Si la radiation incidente est polarisée, le vecteur moment dipolaire électrique doit être remplacé par sa seule composante dans la direction de polarisation de la lumière. Si les molécules sont disposées au hasard (en solution), la polarisation de la lumière incidente n'affecte pas l'intensité d'absorption puisque tous les angles sont possibles entre la direction de polarisation de la lumière et les axes des molécules. Mais si toutes les molécules sont orientées (cristal ou film), seule la lumière polarisée parallèlement à l'un des moments de transition des molécules sera absorbée.

C'est ainsi que l'on peut déterminer que, dans les molécules cycliques sensiblement planes comme les bases des acides nucléiques, les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ sont polarisées dans le plan de la base, alors que les transitions $n \rightarrow \pi^*$ sont polarisées perpendiculairement au plan.

Source : MNHN, Paris

4° Transitions singulet-triplet.

Les transitions singulet-triplet peuvent être observées quand la fonction d'onde de l'état triplet est perturbée, c'est-à-dire lorsque la fonction d'onde réelle de l'état triplet est égale à la fonction d'onde pure de l'état triplet augmentée d'une certaine fraction de celle d'un ou plusieurs états singulets (perturbation nommée couplage spin-orbite) (7). Ce couplage spin-orbite est favorisé par la présence d'atomes lourds, soit dans la molécule, soit dans le solvant et par une faible différence d'énergie entre l'état singulet et l'état triplet impliqués.

B. — DISSIPATION SANS TRANSFERT ÉLECTRONIQUE DE L'ÉNERGIE D'EXCITATION OPTIQUE

1° Définition du rendement quantique d'un processus de désactivation ou d'un processus photochimique.

$$\Phi = \frac{\text{constante de vitesse avec laquelle se fait le processus}}{\text{constante de vitesse avec laquelle les molécules dans l'état fondamental absorbent la lumière.}}$$

2° Dissipation de l'énergie par une molécule dans un état singulet excité.

a) *Fluorescence.*

Une molécule électroniquement excitée peut revenir à son état fondamental avec émission de radiations. Le temps de vie de cette désactivation radiative est relié à la force oscillatoire **f** de la transition par la relation :

$$\tau_0 = 1{,}5 \cdot \frac{g_s}{g_i} \frac{1}{\bar{\nu}^2 \mathbf{f}}$$

$\frac{g_s}{g_i}$ est le rapport des multiplicités des états supérieur et inférieur.

Si $\frac{g_s}{g_i} = 1$ (même multiplicité), la transition radiative est appelée fluorescence (τ de l'ordre de 10^{-8} *s*).

La fluorescence est toujours observée à partir de l'état singulet excité le plus bas (la seule exception connue est l'azulène). La fluorescence a toujours lieu à plus grande longueur d'onde que l'absorption (énergie de transition plus faible). D'autre part le spectre de fluorescence est, dans beaucoup de cas, symétrique du spectre d'absorption par rapport à la transition 0 — 0 (nombres quantiques de vibration nuls dans l'état excité et l'état fondamental) (fig. I-3).

Source : MNHN, Paris

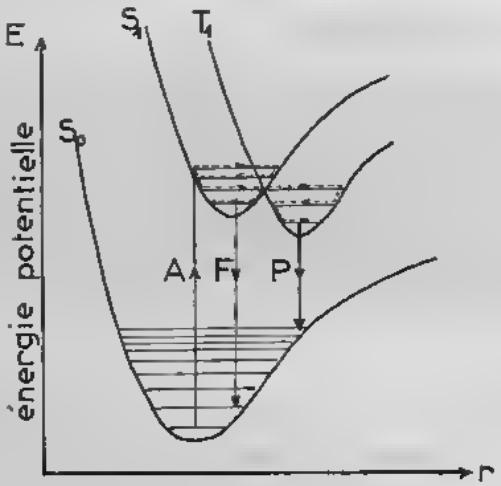


FIG. I-3. — Courbes de Morse.

b) *Conversion interne.*

L'excitation d'une molécule conduit à un état singulet excité à la fois électroniquement et vibrationnellement (principe de Franck-Condon). Cet excès d'énergie vibrationnelle peut être rapidement transféré sur le solvant et la molécule revient alors au niveau vibrationnel 0 de l'état excité.

La fluorescence étant toujours observée à partir de l'état singulet excité le plus bas, cela implique que les états singulets excités supérieurs se désactivent non radiativement jusqu'à l'état singulet excité le plus bas avec une constante de vitesse de l'ordre de $10^{11} - 10^{14}$ s^{-1}. Cette désactivation non radiative est connue sous le nom de conversion interne. De plus, l'état singulet excité le plus bas peut aussi se désactiver non radiativement par conversion interne vers l'état fondamental.

c) *Photodissociation et transition de structure.*

L'excès d'énergie vibrationnelle d'un état excité peut être suffisant pour rompre une liaison et conduire à une photodissociation.

En dehors de cette photodissociation, la molécule excitée à l'état singulet peut aussi donner lieu à d'autres phénomènes photochimiques dont le caractère essentiel est d'être réversible. Le processus photochimique pourra être par exemple une isomérisation, une tautomérisation, une photo-ionisation... Si l'on désigne par S'_1 et S'_0 les états singulets excité et fondamental de la nouvelle espèce formée dans l'état excité (tautomère, ion positif ou négatif), la réaction peut se représenter par le cycle:

$$\begin{array}{ccc} S_1 & \longrightarrow & S'_1 \\ h\nu \uparrow & & \downarrow \\ S_0 & \longleftarrow & S'_0 \end{array}$$

Dans certaines conditions de température ou de milieu par exemple, on peut espérer stabiliser suffisamment S'_0 pour caractériser cette espèce photochimique.

Source : MNHN, Paris

d) *Passage à l'état triplet (" intersystem crossing ").*

Le passage de l'état singulet excité le plus bas à l'état triplet le plus bas est en principe une transition interdite. Elle est néanmoins permise grâce au couplage spin-orbite (voir A-4) (7).

Le rendement quantique de cette transition est donc accru par la présence d'atomes lourds dans la molécule et par une différence d'énergie faible entre les deux états singulet et triplet. Cette dernière condition est particulièrement vérifiée dans le cas des transitions $n-\pi^*$. La grande durée de vie de l'état singulet correspondant à une transition $n \rightarrow \pi^*$ (force oscillatoire faible) favorise également la conversion en triplet. Une molécule ayant un état singulet excité le plus bas de type $n-\pi^*$ aura donc un taux d' " intersystem-crossing " tel que l'on n'observera généralement pas de fluorescence.

3° Dissipation de l'énergie par une molécule dans un état triplet excité.

a) *Phosphorescence, conversion interne et transition de structure.*

La phosphorescence est la transition radiative entre deux états de multiplicités différentes. Seule la transition $T_1 \rightarrow S_0$ est observée dans les molécules organiques. La force oscillatoire de la transition $S_0 \rightarrow T_1$ étant extrêmement faible (A-2), le temps de vie radiatif de l'état triplet T_1 est long. La conversion interne entre les états triplets supérieurs ($T_2 \ldots T_n$) et T_1 est très rapide ($10^{12}\ s^{-1}$) et seul T_1 peut se désactiver radiativement (fig. I-3).

T_1 peut aussi se désactiver non radiativement à la suite d'un "intersystem crossing" entre les états S_0 et T_1 ou de chocs thermiques. Pour observer une phosphorescence intense il faut donc diminuer la probabilité de désactivation non radiative en opérant à basse température ou dans une matrice rigide (par exemple des plastiques) à température ordinaire.

Du fait de son long temps de vie et de son caractère biradicalaire, l'état triplet le plus bas est un intermédiaire photochimique très important, non seulement dans les photodissociations, mais aussi dans les processus photochimiques réversibles, précédemment envisagés à partir de l'état singulet le plus bas (II-B-2).

b) *Fluorescence différée.*

Si la différence d'énergie entre les états S_1 et T_1 est suffisamment faible, l'agitation thermique suffit à faire repasser la molécule de l'état T_1 à l'état S_1. La molécule dans l'état S_1 peut alors émettre sa fluorescence caractéristique (II-B-2), mais le passage par l'état triplet a augmenté son temps de vie.

c) *Transitions triplet-triplet excité — Processus biphotoniques.*

Si l'état triplet est suffisamment peuplé (par excitation $S_0 \rightarrow S_1$ et conversion $S_1 \rightarrow T_1$), le long temps de vie de cet état peut permettre à la molécule de subir de nouvelles transitions permises par les règles de sélection $T_1 \rightarrow T_2$, $T_1 \rightarrow T_3$... Nous avons déjà dit que l'état T_1 était un intermédiaire

Source : MNHN, Paris

photochimique très important. Les molécules dans leur état T_2, T_3 ..., encore plus énergétique, pourront donner lieu à de nouvelles réactions photochimiques (par exemple, éjection d'électrons) ou transférer leur énergie à une molécule voisine

$$S_0 \xrightarrow{h\nu_1} S_1 \rightsquigarrow T_1 \xrightarrow{h\nu_2} T_2, T_3, T_n$$

L'absorption consécutive de deux photons est donc une réaction de la plus haute importance qui conduit à une augmentation de l'énergie d'excitation (tout se passe comme si l'on avait réalisé l'excitation $S_0 \rightarrow T_2, T_3$ ... impossible directement).

C. — INFLUENCE DES INTERACTIONS ENTRE CHROMOPHORES SUR LES PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DE MOLÉCULES ORGANIQUES. CAS DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES

La structure secondaire d'une chaîne polynucléotidique résulte de l'interaction entre les bases superposées et distantes d'environ 3-4 Å. Dans l'ADN et dans une certaine mesure pour les ARN, la structure en double hélice est assurée par les liaisons hydrogène qui fixent l'appariement entre les bases; mais la cohésion de chacune des chaînes est encore due aux interactions entre les bases superposées.

Les interactions doivent donc conduire à des modifications caractéristiques des propriétés spectroscopiques des nucléotides.

Si nous ne nous intéressons qu'au proche U.V., seules les bases pourront être excitées électroniquement, le sucre et le phosphate ne donnant lieu à des transitions que dans l'U.V. lointain.

1° En absorption.

a) L'interaction résonnante entre dipôles induits par la lumière, à la même fréquence ν_1 dans un certain nombre de molécules identiques, conduit à une modification de la forme des bandes d'absorption et de leurs maximums. C'est l'extension, aux polynucléotides, du modèle de l'exciton moléculaire. Cette théorie de l'exciton (8) (Davydov) prévoit, pour des chromophores identiques liés par des chaînes non conjuguées, la formation d'une bande excitonique à N niveaux (pour un système à N chromophores). La largeur de cette bande dépend :

1) de la force oscillatoire de la transition électronique correspondante du monomère.
2) de la disposition spatiale relative des dipôles de transition des différentes molécules.
3) Elle est inversement proportionnelle au cube de la distance entre deux molécules voisines.

Source : MNHN, Paris

La théorie prévoit également la redistribution de l'intensité parmi les divers états excitoniques, les règles de sélection et la polarisation des transitions (9). La constante de vitesse de ce transfert est de l'ordre de 10^{12} s^{-1} dans le cas d'un couplage faible, et supérieure à 10^{12} s^{-1} dans le cas du couplage fort. Une interaction excitonique peut être envisagée pour des molécules différentes dont les spectres d'absorption se recouvrent. Bien que l'ADN contienne quatre types de bases, le recouvrement des bandes d'absorption à 2 600 Å est appréciable. Dans cette région d'absorption commune, il existe une dégénérescence vibrationnelle et l'on peut envisager une interaction du type excitonique.

b) L'interaction non résonnante entre un dipôle de transition à la fréquence ν_1 et les dipôles de polarisation des transitions, de fréquence ν_2, des molécules voisines (interaction du type forces de dispersion) entraîne le phénomène bien connu d'hypochromisme (si les dipôles sont de même sens) ou hyperchromisme (dans le cas contraire) (13). Si l'hypochromisme est un test couramment utilisé pour les études de stabilité et d'interactions dans les acides nucléiques, le rôle de l'exciton n'a été démontré que par ses conséquences dans les mesures de dispersion optique rotatoire et de dichroïsme circulaire. Le fait que deux bases appariées d'un même plateau sont proches l'une de l'autre peut entraîner aussi un hyperchromisme; mais ce dernier sera toujours très faible comparé à celui résultant des interactions entre les plateaux superposés (10, 11, 12).

2° En émission.

a) *Les conséquences de la théorie de l'exciton pour les propriétés émissives* (fluorescence et phosphorescence) ont été prévues de façon théorique (14). Les variations relatives des rendements de fluorescence et de phosphorescence dépendent de l'orientation des moments de transition des différentes molécules interagissantes.

b) *Transfert d'excitation par résonance.*

Ce mécanisme de transfert d'énergie a été proposé par Förster (15). L'énergie d'excitation peut passer d'une molécule dans son état singulet excité le plus bas à une autre molécule, identique ou différente, dans son état fondamental avant que la première n'ait eu le temps de se désactiver. Il suffit que le spectre de fluorescence du donneur recouvre le spectre d'absorption de l'accepteur. La vitesse de transfert est inférieure à 10^{11} s^{-1}; elle est proportionnelle au carré de l'énergie d'interaction entre les deux dipôles électriques induits par la lumière, elle varie donc comme $\frac{1}{R^6}$ où R est la distance entre les molécules interagissantes. C'est un mécanisme d'interaction à longue distance (50-100 Å) qui s'applique particulièrement à des molécules de nature différente. Il diffère donc fondamentalement du mécanisme de l'exciton. La vitesse de transfert de la molécule donneur D à la molécule accepteur A s'écrit sous la forme (16).

$$k\,D \rightarrow A = \frac{9\,000 \log 10\ K^2}{128\ \pi^5\ n^4\ N\ \overline{\nu}_D^4\ R^6} \int_0^{\infty} f_D(\overline{\nu}) \cdot \varepsilon_A(\overline{\nu}) \cdot \frac{d\overline{\nu}}{\overline{\nu}^4}$$

Source : MNHN, Paris

$\bar{\nu}$ est le nombre d'onde;

ε_A ($\bar{\nu}$) est le coefficient d'extinction de l'accepteur A;

f_D ($\bar{\nu}$) est la distribution spectrale de fluorescence du donneur D;

$\mathcal{C}_D^0$ est le temps de vie du donneur D excité;

n l'indice de réfraction du solvant;

R la distance entre les 2 molécules;

K ($= \cos \varphi_{DA} - 3 \cos \varphi_A \cdot \cos \varphi_D$) dépend de l'orientation mutuelle des vecteurs moments de transition des deux molécules.

Ce transfert peut être étudié par fluorescence puisqu'il doit se traduire par une extinction de la fluorescence du donneur et une augmentation de fluorescence de l'accepteur.

Ce transfert doit aussi être distingué du mécanisme banal de réabsorption de la lumière émise par fluorescence.

Il a été montré récemment qu'il s'appliquait non seulement au transfert entre états singulets, mais aussi au transfert d'un état triplet à un état singulet et d'un état singulet à un état triplet, et même pour l'annihilation triplet-triplet.

c) *Annihilation triplet-triplet.*

L'interaction de deux molécules dans leur état triplet peut conduire à une fluorescence retardée. Ce mécanisme d'annihilation triplet-triplet produit une molécule dans un état singulet excité supérieur qui se désactive par conversion interne jusqu'en S_1 et qui ensuite peut émettre la fluorescence; l'autre molécule est revenue à son état fondamental.

Cette annihilation de deux molécules à l'état triplet constitue un processus de multiplication de l'énergie détenue par une molécule, ce qui peut entraîner des conséquences photochimiques importantes.

d) *Transfert triplet-triplet :* $T \rightarrow T$.

Nous désignerons par transfert $T \rightarrow T$, le transfert d'énergie électronique d'une molécule excitée dans son état triplet à une molécule à l'état fondamental qui se trouve ainsi portée dans l'état triplet (à condition que le niveau triplet de l'accepteur ait une énergie plus faible que celui du donneur). En solution vitreuse, on peut, par exemple, observer une phospborescence sensibilisée de l'accepteur A par le donneur D, l'accepteur A n'étant pas excité directement (17). L'étude de cette phosphorescence sensibilisée, en fonction des concentrations en D et A, montre que la sphère d'action de l'accepteur a un rayon de 10 – 15 Å. La faible valeur de cette distance a conduit à expliquer le transfert $T \rightarrow T$ par une interaction de résonance d'échange due au recouvrement des nuages électroniques du donneur et de l'accepteur. La probabilité de transfert décroît de façon exponentielle avec la distance (18) (19).

La mise en évidence de forces d'échanges électroniques peut donc être faite par l'étude du transfert entre états triplets par spectroscopie d'émission, le transfert entraînant l'extinction de la phosphorescence du donneur et l'augmentation de celle de l'accepteur. La fluorescence des deux partenaires doit rester identique à ce qu'elle serait s'il n'y avait pas d'interactions.

Source : MNHN, Paris

e) *Exciton triplet.*

De même que les interactions entre molécules identiques dans leur premier état singulet excité peuvent conduire à la formation d'une bande excitonique, le transfert de l'excitation triplet entre molécules identiques peut se faire par un mécanisme excitonique. L'énergie d'interaction pour l'exciton triplet semble être de l'ordre de $10-100$ cm^{-1} pour les triplets $\pi-\pi^*$ dans les cristaux moléculaires aromatiques. Elle est d'un ordre de grandeur plus faible pour les triplets $n-\pi^*$ qui sont plus localisés dans la molécule (20, 21).

Bien que cette énergie d'interaction entre triplets soit plus faible (2 à 10 fois) qu'entre états singulets, la longue durée de vie de l'état triplet en fait l'agent de transfert d'énergie le plus efficace. En effet, même si la constante de vitesse de transfert $T \rightarrow T$ est de l'ordre de 10^{12} s^{-1}, pendant le temps de vie d'un état triplet ($\backsim$1s), 10^{12} transitions de ce type peuvent avoir lieu.

f) *Formation d'excimères.*

Une molécule excitée peut, en s'approchant d'une molécule dans son état fondamental, donner naissance à un dimère dans un état excité (excimère). Au cours de sa désactivation, cet excimère restitue deux molécules du monomère à l'état fondamental. L'excimère est donc un dimère stable seulement dans l'état excité et non dans l'état fondamental. En conséquence il ne doit apparaître aucune bande d'absorption nouvelle. Par contre, la désactivation de l'excimère peut se faire radiativement avec émission de fluorescence, toujours située à plus grande longueur d'onde que celle du monomère (22, 23).

D. — INFLUENCE DES INTERACTIONS SUR LES PROPRIÉTÉS PHOTOCHIMIQUES DES ACIDES NUCLÉIQUES

Les interactions doivent conduire, comme nous venons de le voir, à un transfert de l'énergie d'excitation optique (excitons singulet ou triplet; transfert $S \rightarrow S$ (Förster) ou $T \rightarrow T$ (Terenin)). Cette énergie est nettement supérieure à celle mise en jeu dans les réactions biologiques. Néanmoins, l'étude des réactions photochimiques, qui sont la conséquence de l'excitation optique, n'est pas dépourvue d'intérêt pour l'étude des réactions biologiques. Par exemple, les sites des mutations induites par les radiations ultraviolettes sont souvent les mêmes que ceux des mutations spontanées, l'irradiation ne faisant que multiplier le nombre de ces mutations. D'où la possibilité d'avoir accès au mécanisme de ces mutations si l'on connaît le résultat de l'action des rayonnements U.V. Le plus souvent, les résultats photochimiques obtenus avec les nucléotides ont été généralisés aux acides nucléiques. Or il est certain que les interactions, qui entraînent un transfert de l'énergie d'excitation optique, entraînent aussi une localisation de cette énergie en certains points particuliers de la macromolécule.

Source : MNHN, Paris

Le résultat de l'irradiation d'un acide nucléique n'est donc pas le même que celui obtenu si l'on irradie les nucléotides séparément ou même un mélange de nucléotides de même composition globale que l'acide nucléique. On doit observer une photosensibilisation de certains sites ou une photoprotection suivant les cas. En outre, des réactions photochimiques nouvelles peuvent résulter des interactions dans la macromolécule : par exemple, une absorption biphotonique ou une annihilation triplet-triplet peut conduire à un état excité, d'énergie supérieure à celle du photon incident, qui pourra transmettre son énergie à une molécule voisine et donner lieu à une réaction photochimique non prévue.

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE II

COMPOSÉS ET TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

Les oligonucléotides présentent en solution une structure secondaire analogue à celle rencontrée dans les polynucléotides et les acides nucléiques. Les interactions responsables de cette structure secondaire se manifestent déjà dans les dinucléotides. Nous nous sommes donc engagés dans l'étude des problèmes envisagés au chapitre précédent en essayant d'analyser, de façon aussi approfondie que possible, le comportement électronique et photochimique des constituants des acides nucléiques et de leurs combinaisons les plus simples : les dinucléotides. Cette étude a pu être réalisée parce que Mr A. M. MICHELSON a synthétisé les dérivés souhaités, après que nous ayons été mutuellement convaincus de leur intérêt pour le présent travail.

En outre, nous avons pu disposer d'un laboratoire que Mr P. DOUZOU avait conçu pour l'étude spectroscopique de molécules organiques et qui nous permettait notamment de combiner l'intervention des spectroscopies optiques (absorption et émission) et hertzienne (résonance paramagnétique électronique) dans des conditions de température analogues (de 77° K à environ 373° K).

A. — COMPOSÉS ÉTUDIÉS ET SOLVANTS UTILISÉS

1° Composés.

Les dinucléotides, les dinucléosides phosphate et pyrophosphate ont été synthétisés dans le laboratoire de Mr A. M. MICHELSON suivant les méthodes décrites par Mr A. M. MICHELSON (25). Les bases, nucléosides et nucléotides, qui nous ont servi de référence, sont des produits commerciaux provenant des sociétés SIGMA ou CALBIOCHEM. Certains dérivés des bases et des nucléosides (en particulier des dérivés méthylés) ont été synthétisés par MM. F. POCHON et J. L. RIVAIL.

Nomenclature.

La numérotation des atomes des nucléosides puriques et pyrimidiques est représentée sur la figure II-1.

Les symboles utilisés pour représenter les différents composés sont les suivants :

— les nucléosides sont représentés par leur première lettre (A = adénosine, G = guanosine, C = cytidine, U = uridine, T = thymidine),

Source : MNHN, Paris

— les nucléosides monophosphate (dans lesquels le groupement phosphate est lié en 5′ au ribose) sont représentés par XMP où X représente le nucléoside (X = A, G, U, C, T),

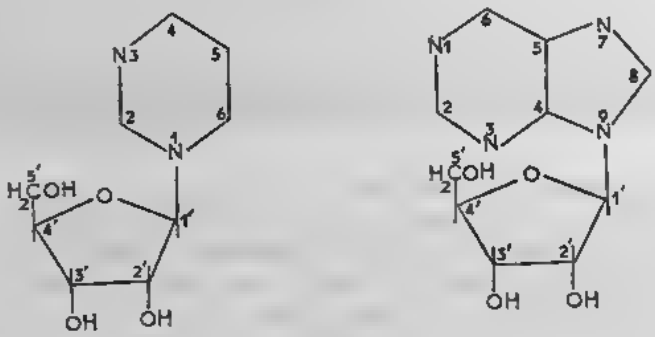
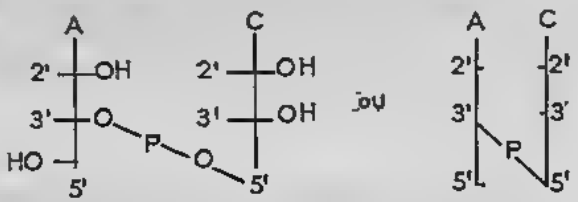
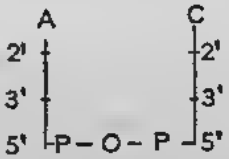


FIG. II-1.

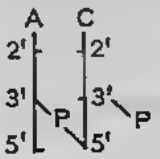
— les dinucléosides phosphate ont une représentation symbolique précisant les groupements OH estérifiés. Par exemple A3p5C indique que la liaison phosphodiester se fait entre les groupements OH 3′ de l'adénosine et 5′ de la cytidine. On peut aussi utiliser la représentation schématique suivante :



Le dinucléoside pyrophosphate sera représenté par



les dinucléotides ont une structure du type A3p5C3p



L'introduction du second groupement phosphate ne modifiant ni la structure secondaire, ni les propriétés physiques du composé, nous désignerons indifféremment sous le nom de dinucléotide des composés tels que A3p5C ou A3p5C3p.

Source . MNHN, Paris

2° **Solvants.**

Les études à basse température (77° K) d'absorption, d'émission et de R. P. E. nécessitent des milieux solvants transparents (surtout pour les mesures d'absorption). Lorsque la solubilité des composés étudiés dans l'éthanol est suffisante (10^{-4} à 10^{-4} M), ce solvant est utilisé pour former des verres transparents à 77° K, seul ou en association avec de l'éther et de l'isopentane (éther : isopentane : éthanol 5 : 5 : 2 (v/v) — symbole : E.P.A.). Dans le cas général où les composés sont seulement solubles dans l'eau, les solutions ont été faites dans l'eau, puis diluées avec du propylène glycol (Merck) dans les proportions 1v/1v. Des mélanges eau-éthanol (1 – 4 v/v) ont également été utilisés dans certaines mesures d'émission. Bien que ne donnant pas un milieu transparent à 77° K, ces mélanges ont montré qu'ils pouvaient donner une bonne reproductibilité.

Le problème le plus difficile à résoudre concerne la pureté des solvants dits « spectroscopiquement purs ». Leur analyse en absorption ne révèle aucune impureté chimique, mais la présence d'impuretés à l'état de traces peut se manifester par de la luminescence, ou même par du paramagnétisme. Après les purifications d'usage (distillations, passage sur colonne d'alumine), nous nous sommes systématiquement pliés à la règle des « solutions témoins » au cours de toutes les expériences. Les cellules et les tubes de mesures étaient évidemment soumis, à vide, aux mêmes vérifications. Étant donné les solvants utilisés et l'absence de systèmes chimiques tels que les tampons, nous avons pu éviter la luminescence et le paramagnétisme parasites.

B. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES

1° **Absorption.**

Les mesures d'absorption ont été réalisées avec un spectrophotomètre à prisme CARY 15 à double faisceau. Un dispositif d'asservissement de la fente de sortie du monochromateur permet de travailler à énergie constante. La possibilité de revenir au point de départ d'un spectre avec une excellente précision permet d'enregistrer des réseaux de courbes d'absorption ce qui présente un grand intérêt pour des études cinétiques ou photochimiques. Une échelle 0 – 0,1 en densité optique permet de réaliser des spectres de différence avec une très grande précision. Les cellules utilisées à 20° C sont en quartz suprasil (épaisseur variable de 0,1 à 100 mm) et peuvent être thermostatées.

Pour l'utilisation à basse température (entre 77° K et 293° K), deux cellules ont été construites. Il faut éviter que le liquide réfrigérant (par exemple l'azote liquide) ne soit dans le faisceau lumineux et empêcher le givrage des faces de la cellule de mesure.

a) La cellule du premier type se compose d'un support en laiton en forme de U dans lequel on place une cellule en quartz à robinet rodé. Ce U en laiton est refroidi, soit par un courant d'azote liquide qui circule à

Source : MNHN, Paris

l'intérieur, soit par un courant d'azote gazeux préalablement refroidi et permettant de travailler à des températures variant de 77° K à 293° K. L'ensemble du support et des conduits d'amenée de l'azote est placé dans une cuve cylindrique en laiton dans laquelle on fait le vide pour éviter tout givrage (figure II-2).

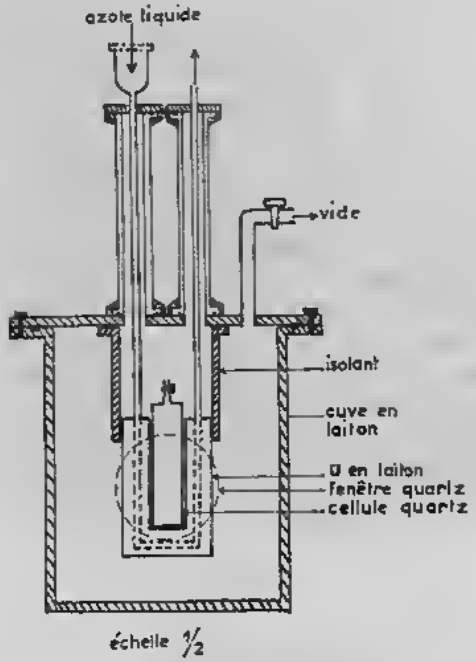


FIG. II-2.

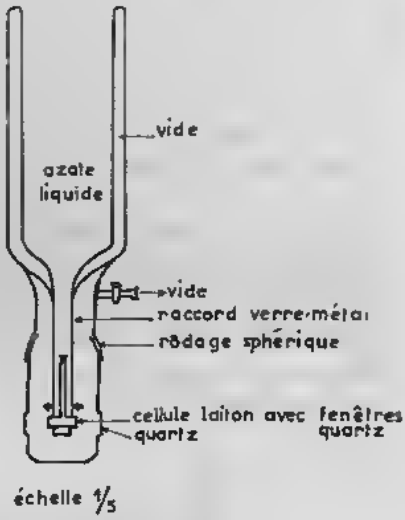


FIG. II-3.

b) Le second type d'appareil est composé d'un vase Dewar dont la partie inférieure est terminée par un raccord verre-métal et permet la circulation d'azote liquide autour d'une cellule en laiton à fenêtre de quartz (figure II-3).

2° Émission.

Le spectrophosphorimètre utilisé est un appareil commercial AMINCO-KEIRS comportant deux monochromateurs à réseau, disposés à angle droit (figure II-4). Pour les mesures de fluorescence à 20° C, on emploie des cellules en quartz de 2 mm ou 10 mm d'épaisseur ayant leurs quatre faces optiquement polies. Pour l'utilisation en phosphorescence à 77° K, l'azote liquide est contenu dans un vase Dewar en quartz et l'échantillon dans un tube en quartz de 2 à 3 mm de diamètre. Ce tube peut être placé en position d'émission optimum grâce à un système de réglage à deux vis à 90° construit au laboratoire et assurant une bonne reproductibilité des mesures (5 %). Les déclins de phosphorescence sont enregistrés à l'aide d'un oscilloscope TEKTRONIX équipé d'une caméra POLAROID. Le plus court temps de vie mesurable correspond à la constante de temps de l'amplificateur et est

Source : MNHN, Paris

de l'ordre de $8 \cdot 10^{-2}$ s. Les maximums d'excitation aussi bien de la fluorescence que de la phosphorescence diffèrent généralement des maximums d'absorption à cause de la répartition spectrale énergétique non uniforme de la source d'excitation (X BO 150 W). La courbe de correction des spectres d'excitation est faite par comparaison avec une solution de sulfate de quinine pour laquelle le rendement de fluorescence ne dépend pas de la longueur d'onde d'excitation.

De même les spectres d'émission doivent être corrigés pour tenir compte de la variation de sensibilité du photomultiplicateur (1P 28) avec la longueur d'onde.

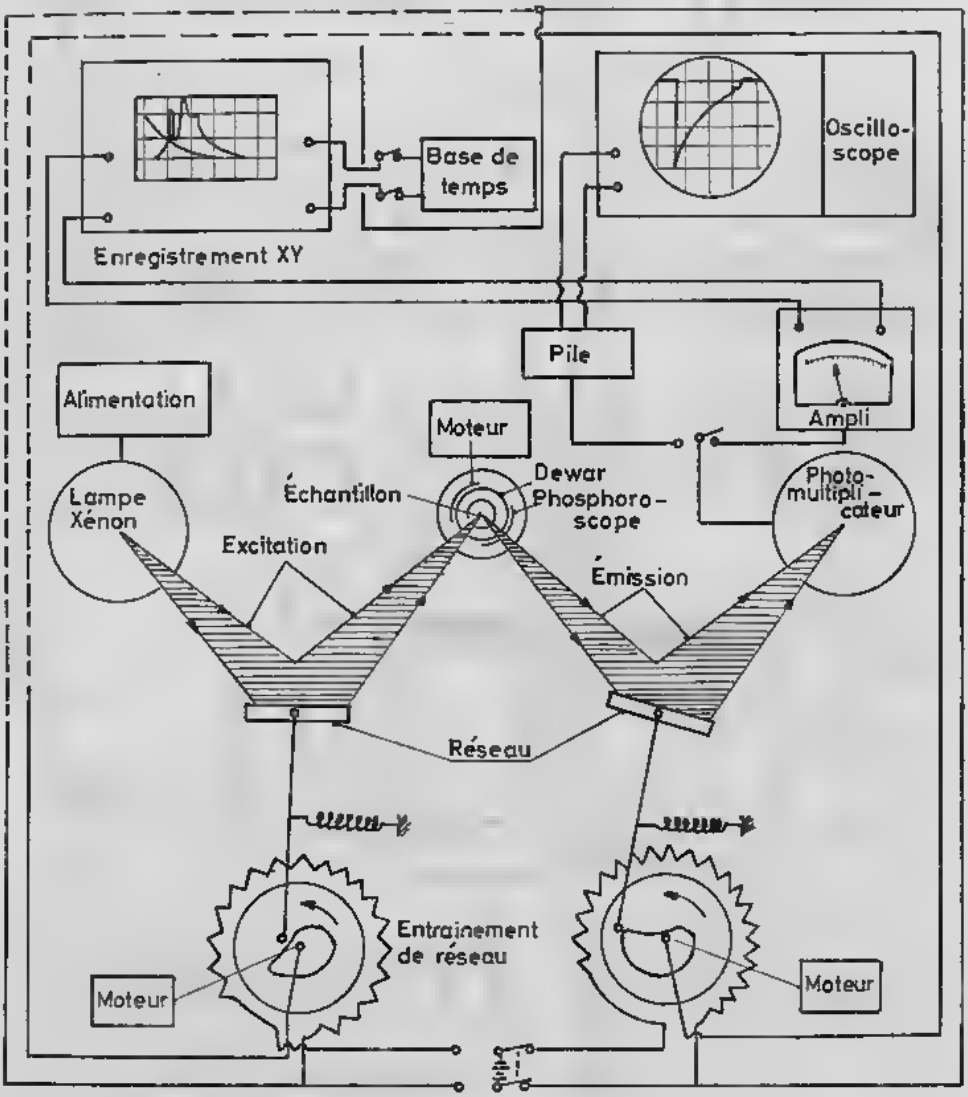


FIG. II-4.

Source : MNHN, Paris

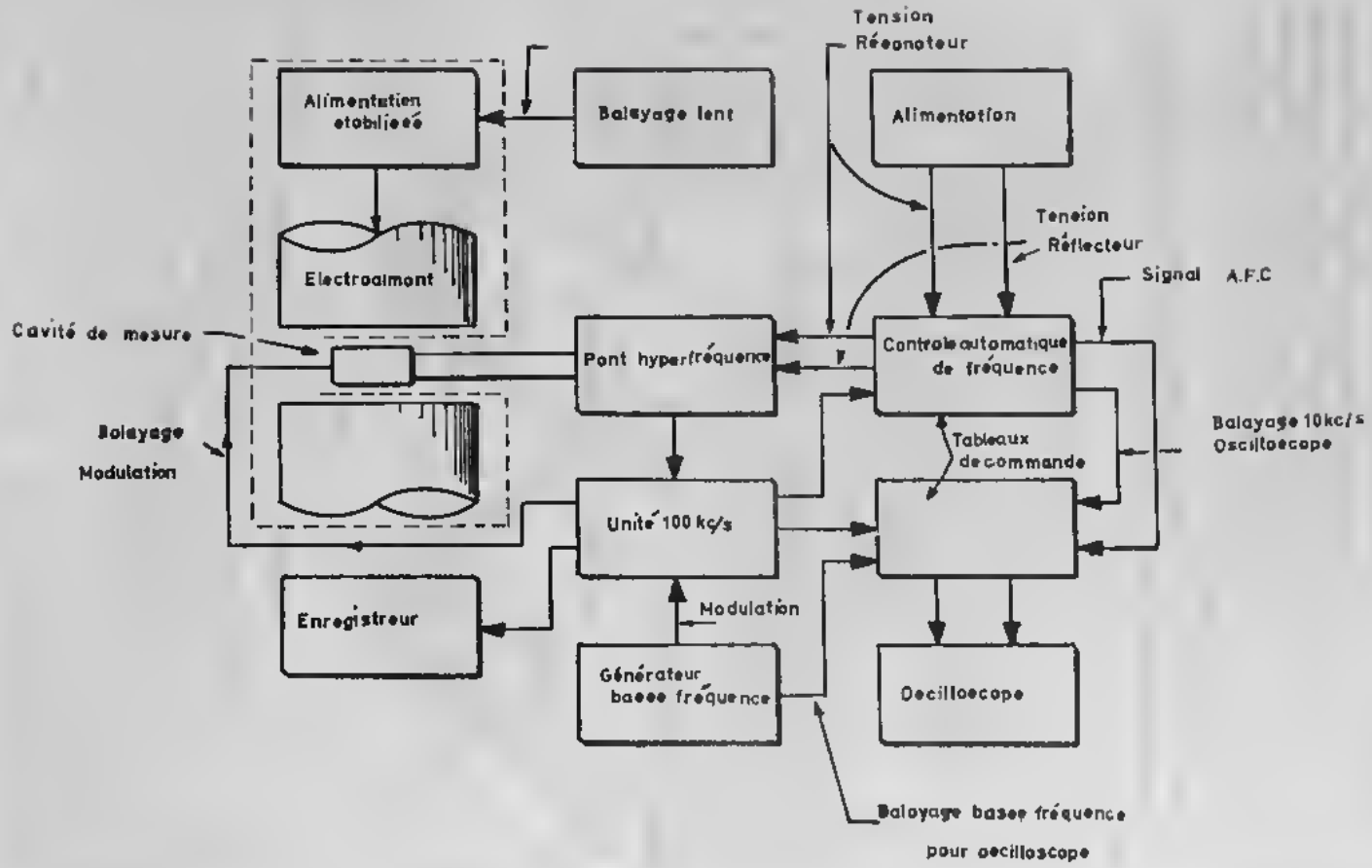


FIG. II-5. — Schéma de principe du spectromètre R. P. E.

Source : MNHN, Paris

Pour déterminer un rendement quantique, soit de fluorescence, soit de phosphorescence, on compare la substance étudiée avec une substance de rendement quantique bien connu (par exemple le rendement de fluorescence du sulfate de quinine est 0,55).

L'excitation étant faite à une même longueur d'onde, le rapport des rendements quantiques Φ est donné par la relation (24) :

$$\frac{\Phi_2}{\Phi_1} = \frac{F_2}{F_1} \times \frac{D_1}{D_2}$$

où F est l'intensité de fluorescence mesurée par l'aire de la courbe de fluorescence et D la densité optique de la solution.

3° **Résonance paramagnétique électronique** (R.P.E.).

Cette technique a été utilisée pour étudier la production photochimique de radicaux libres et pour détecter la résonance de molécules portées dans leur état triplet par excitation optique.

Elle consiste à induire des transitions entre les sous-niveaux d'énergie Zeeman d'un système comportant un moment magnétique et placé dans un champ magnétique statique. Le schéma du principe de l'appareil est représenté sur la figure II-5. On enregistre toujours la dérivée de la courbe d'absorption.

a) *Etude des radicaux :* un radical possédant un électron célibataire $\left(s = \pm\frac{1}{2}\right)$, l'application d'un champ magnétique H_0 entraîne un dédoublement du niveau d'énergie (fig. II-6 *a*).

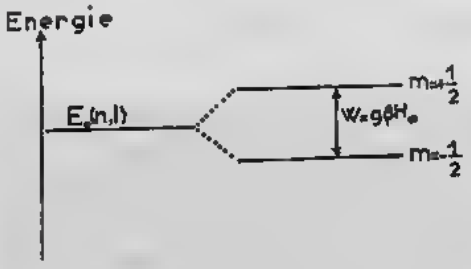


FIG. II-6 *a*. — Niveaux d'énergie d'un radical dans un champ magnétique H_0.

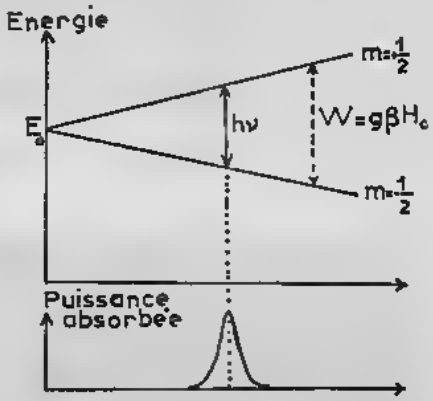


FIG. II-6 *b*. — Résonance d'un radical libre.

La condition de résonance s'écrit $h\nu = g\beta H_0$

g est le facteur de Landé,

β le magnéton de Bohr,

ν la fréquence de l'onde électromagnétique incidente.

Source : MNHN, Paris

Dans les mesures de R. P. E., ν est fixe et c'est H_0 que l'on fait varier, la différence d'énergie entre les sous-niveaux Zeeman variant avec H_0 (figure II-6 *b*).

b) *Etude des états triplets moléculaires.*

Une molécule dans un état triplet possède trois sous-niveaux d'énergie qui sont dégénérés en l'absence d'interactions magnétiques. A chacune des trois fonctions de spin de l'état triplet est alors associée la même énergie. La dégénérescence peut être levée sous l'influence de deux facteurs :

1) l'interaction dipolaire mutuelle des spins des deux électrons optiques en l'absence de tout champ extérieur.
2) l'interaction des électrons avec un champ magnétique extérieur (effet Zeeman).

L'interaction entre les spins des deux électrons introduit les énergies de perturbation en champ nul X, Y, Z, définies sur la figure II-7, telles que $X + Y + Z = 0$ puisqu'il s'agit d'une interaction intérieure au système ne modifiant pas l'énergie totale.

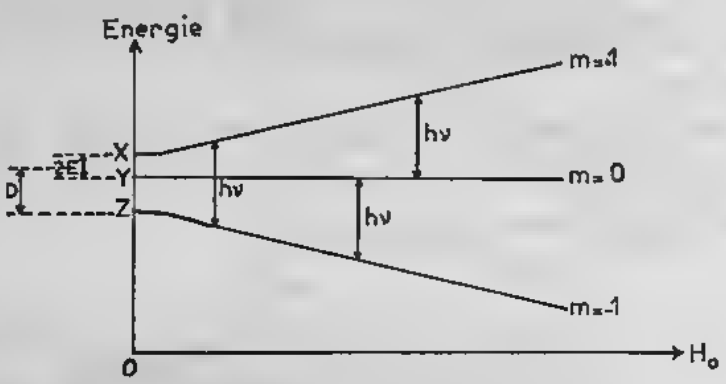


FIG. II-7. — Niveaux d'énergie d'un état triplet.

Chacun des niveaux d'énergie dus à l'action d'un champ magnétique extérieur est caractérisé par un nombre quantique m (— I,0 ou + I). En principe, seules les transitions $\Delta m = \pm 1$ sont permises. En réalité des transitions, désignées conventionnellement par $\Delta m = 2$, ont lieu pour une valeur du champ suffisamment faible pour que l'énergie d'interaction dipolaire soit comparable à l'énergie d'interaction Zeeman. Ce seront toujours ces transitions « $\Delta m = 2$ » qui seront observées, en polarisation perpendiculaire, pour les molécules étudiées ici.

La connaissance des transitions $\Delta m = 1$ et $\Delta m = 2$ permet de déterminer X, Y, Z. La seule détermination de la transition $\Delta m = 2$ (H min.), permet de calculer la valeur de $(D^2 + 3E^2)^{1/2}$ qui est une mesure globale de l'interaction dipolaire :

$$D^* = (D^2 + 3E^2)^{1/2} = \left[\frac{3}{4}(h\nu)^2 - 3(g\beta H_{min.})^2\right]^{1/2}$$

Source : MNHN, Paris

$H_{min.}$ est le champ minimum pour lequel le signal de résonance, dérivée de la courbe d'absorption, a son intensité maximum.

Pour obtenir une population suffisante de l'état triplet, on utilise une cavité résonante à transmission optique. Il est ainsi possible d'exciter directement l'échantillon par les rayonnements ultra-violets tout en effectuant les mesures magnétiques. Ces mesures sont faites à 77° K (pour éviter une désactivation non radiative trop importante de l'état triplet). L'échantillon est dans un tube en quartz, analogue à celui utilisé pour les mesures de phosphorescence, immergé dans l'azote liquide contenu dans un vase Dewar lui-même en quartz.

L'utilisation de cette technique de résonance paramagnétique électronique permet d'obtenir, dans certains cas, des signaux de résonance bien distincts pour des ensembles de molécules dans l'état triplet dont les spectres de phosphorescence et les temps de vie peuvent être très voisins. Elle permet donc de séparer ces ensembles de molécules dans un mélange mieux que la spectropbosphorimétrie. Cependant la sensibilité plus faible de la méthode de résonance limite son emploi à quelques cas privilégiés.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE III

ÉTUDE DES ÉTATS EXCITÉS DES BASES, NUCLÉOSIDES, NUCLÉOTIDES ET DE DÉRIVÉS SUBSTITUÉS

Avant d'aborder l'étude de l'influence des interactions sur les propriétés spectroscopiques des composants des acides nucléiques, il est évidemment nécessaire de posséder le maximum d'informations sur les propriétés des molécules isolées (c'est-à-dire n'admettant d'interactions qu'avec le solvant). Si les spectres d'absorption sont connus et utilisés depuis longtemps, il n'en est pas de même des caractéristiques d'émission et de résonance paramagnétique électronique. Aussi nous attacherons-nous dans ce chapitre à caractériser les états électroniques fondamentaux et excités des composants des acides nucléiques et plus particulièrement l'état triplet le plus bas qui joue un rôle essentiel dans le transfert de l'énergie entre les bases d'un dinucléotide (Chapitre IV) et dans certaines réactions photochimiques (Chapitre V).

A. — ÉTUDE DES TRANSITIONS ENTRE ÉTATS SINGULETS

L'état fondamental de tous les composés étudiés est un état singulet. Donc les transitions singulet-singulet, permises par les règles de sélection, sont responsables des phénomènes d'absorption et de fluorescence.

1° Absorption.

L'interaction entre deux bases à l'état excité (dans un dinucléotide ou dans un plateau de l'A.D.N.) dépend de la nature des transitions et de leurs directions de polarisation. Il est possible de déterminer par le calcul les polarisations des transitions sur les composés non substitués que sont la purine et la pyrimidine. La détermination expérimentale de ces polarisations est particulièrement délicate. On doit utiliser, par exemple, l'absorption polarisée de monocristaux dont la structure a été préalablement déterminée aux rayons X.

a) *Etude théorique de la symétrie des configurations électroniques et de la polarisation des transitions dans le cas de la pyrimidine et de la purine.*

Les axes de coordonnées choisies pour les molécules de pyrimidine et de purine sont représentées sur la figure III-1. Le plan *xy* est celui de chacune des molécules, l'axe *z* est perpendiculaire à ce plan. Les éléments de symétrie

Source : MNHN, Paris

de la molécule de pyrimidine sont les deux plans de symétrie σ (yz) (plan yz) et σ (xy) (plan xy) et l'axe de symétrie C_2, intersection de ces deux plans (axe de rotation d'ordre 2). On peut effectuer sur la molécule les opérations de symétrie correspondantes et, évidemment, l'opération identité (I) qui

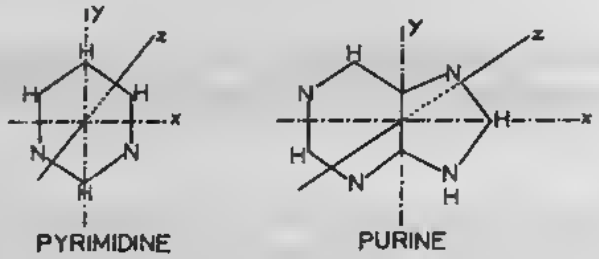


FIG. III-1.

se retrouve pour tous les groupes ponctuels et qui peut être considérée comme une rotation de 360° autour de l'axe z par exemple. La molécule de pyrimidine appartient donc au groupe ponctuel C_{2v} auquel correspondent les quatre espèces de symétrie données par la table de caractères de la figure III-2 (6) (le produit de deux opérations de symétrie est équivalent à une autre symétrie). La molécule de purine possède moins d'éléments de symétrie que la molécule de pyrimidine et appartient au groupe ponctuel C_{1h} (plan de symétrie σ (xy) et opération identité I). La table de caractères de ce groupe est représentée figure III-2.

M	C_{2v}	I	C_2	$\sigma_v(yz)$	$\sigma_v'(xy)$
y	A_1	1	1	1	1
	A_2	1	1	-1	-1
z	B_1	1	-1	1	-1
x	B_2	1	-1	-1	1

M	C_{1h}	I	$\sigma_h(xy)$
x,y	A'	1	1
z	A''	1	-1

FIG. III-2. — Tables de caractères des groupes ponctuels C_{2v} et C_{1h}.

Dans la première colonne de chaque table de caractères sont données les symétries des trois composantes Mx, My et Mz du moment dipolaire électrique induit par la lumière.

Quand une opération de symétrie S est appliquée à une fonction d'onde Ψ, le résultat doit être le produit d'une constante s par la fonction d'onde si le groupe de symétrie n'admet que des représentations unidimensionnelles, ce qui est le cas pour les molécules considérées ici :

$$S\ \Psi = s\ \Psi$$

Chaque orbitale moléculaire peut être ainsi classée dans l'une des espèces de symétrie précédemment définies. Par exemple, les 9 orbitales π possibles de la purine sont antisymétriques par rapport au plan de symétrie σ (xy),

Source : MNHN, Paris

donc elles appartiennent à l'espèce a''. Par contre les 3 orbitales n sont symétriques par rapport à ce même plan et seront classées dans l'espèce a' (les lettres minuscules sont réservées aux orbitales et les lettres majuscules aux configurations moléculaires). Dans le cas de la pyrimidine, l'interaction entre les orbitales n_a et n_b conduit à deux orbitales n_+ et n_-, combinaisons linéaires des précédentes, qui sont symétriques ou antisymétriques ($s = \pm 1$) pour toutes les opérations de symétrie du groupe ponctuel C_{2v} (fig. III-3). Ces deux orbitales n_+ et n_- appartiennent respectivement aux espèces de symétrie a_1 et b_2.

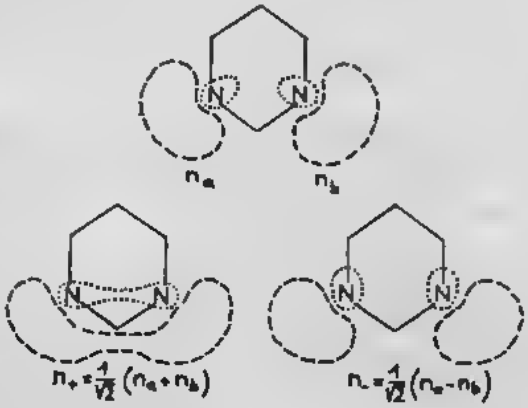


FIG. III-3. — Orbitales n de la pyrimidine.

La classification en espèces de symétrie des orbitales moléculaires de la purine et de la pyrimidine est représentée sur la figure III-4, l'ordre des énergies croissantes allant de bas en haut (26).

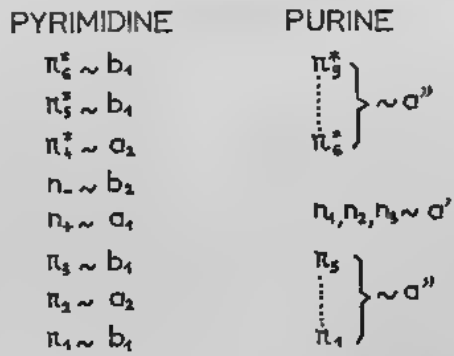


FIG. III-4. — Classification des orbitales moléculaires.

La symétrie d'un état moléculaire correspondant à une distribution donnée des électrons est obtenue en faisant le produit des symétries des orbitales correspondant à chaque électron. La probabilité de transition P entre deux de ces états est proportionnelle au carré de l'intégrale $\int_{-\infty}^{+\infty} \Psi^*_i \mathcal{M} \Psi_f \, dv$; (paragraphe 1 — A — 1). Pour que cette intégrale ne s'annule pas — c'est-à-dire pour que la transition soit permise — il faut

Source : MNHN, Paris

que la fonction à intégrer soit symétrique pour toutes les opérations de symétrie. Si le produit des espèces de symétrie correspondant à Ψ_i, $\mathcal{M}$ et Ψ_f est antisymétrique par rapport à l'une des opérations de symétrie, la transition est interdite. S'il est symétrique par rapport à toutes les opérations de symétrie, pour une composante du vecteur M, la transition est permise et polarisée suivant la composante de ce vecteur M.

Les résultats concernant les symétries des états électroniques de la purine et de la pyrimidine, ainsi que les règles de sélection et la polarisation des transitions permises sont schématisés sur la figure III-5. On peut ainsi en déduire que les transitions $n \rightarrow \pi^*$ permises sont polarisées perpendiculairement au plan de la molécule et que les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ permises sont polarisées dans le plan de la molécule.

	Etat	Configuration electronique	Symétrie	Règles de sélection
PYRIMIDINE C_{2v}	S_0	$\pi_1^2\,\pi_2^2\,\pi_3^2\,n_+^2 n_-^2$	$\sim A_1$	
	$S_{(n\text{-}\pi^*)}$	$\pi_1^2\,\pi_2^2\,\pi_3^2\,n_+^2 n_-^1\,\pi_6^{*1}$	$\sim b_2 \times a_2 \sim B_1$	permise z
	$S_{(n\text{-}\pi^*)}$	$\pi_1^2\,\pi_2^2\,\pi_3^2\,n_+^2 n_-^1\,\pi_5^{*1}$	$\sim a_1 \times a_2 \sim A_2$	interdite
	$S_{(\pi\text{-}\pi^*)}$	$\pi_1^2\,\pi_2^2\,\pi_3^1\,n_+^2 n_-^2\,\pi_6^{*1}$	$\sim b_1 \times a_2 \sim B_2$	permise x
	$S_{(\pi\text{-}\pi^*)}$	$\pi_1^2\,\pi_2^2\,\pi_3^1\,n_+^2 n_-^2\,\pi_5^{*1}$	$\sim b_1 \times b_1 \sim A_1$	permise y
PURINE C_{1h}	S_0	$\pi_1^2 \ldots \pi_4^2\,\pi_5^2\,n_1^2\,n_2^2\,n_3^2$	$\sim A'$	
	$S_{(n\text{-}\pi^*)}$	$\pi_1^2 \ldots \pi_4^2\,\pi_5^2\,n_1^2\,n_2^2\,n_3^1\,\pi_6^{*1}$	$\sim a' \times a'' \sim A''$	permise z
	$S_{(n\text{-}\pi^*)}$	$\pi_1^2 \ldots \pi_4^2\,\pi_5^1\,n_1^2\,n_2^2\,n_3^1\,\pi_6^{*1}$	$\sim a'' \times a'' \sim A'$	permise x,y

FIG. III-5.

La transition $n \rightarrow \pi^*$ permise dans le cas de la purine et de la pyrimidine est observée aux environs de 300 mμ dans les hydrocarbures et subit un déplacement hypsochrome très net dans les solvants à groupements hydroxyles. Les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ de plus faible énergie sont observées vers 240 mμ pour la pyrimidine et 260 mμ pour la purine. La force oscillatoire des transitions $n \rightarrow \pi^*$ est toujours faible comparée à celle des transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ à cause du recouvrement assez faible des deux orbitales et de la redistribution de charge qui accompagne ces transitions.

b) *Etude expérimentale : spectres d'absorption et polarisation des transitions des bases et nucléosides.*

Les bases et les nucléosides présentent tous une bande d'absorption complexe vers 260-270 mμ résultant à la fois de transitions $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$. La substitution par le ribose, en position 1 pour les bases pyrimidiques, en 9 pour les bases puriques, entraîne un déplacement bathochrome du spectre d'absorption. Par contre le passage du nucléoside au nucléotide, ou du nucléoside au désoxynucléoside ne modifie pas le spectre d'absorption (27). Par la suite, ce seront pratiquement toujours les nucléosides qui

Source : MNHN, Paris

seront pris comme éléments de comparaison avec les dinucléosides phosphate ou pyrophosphate, la remarque précédente s'appliquant non seulement aux spectres d'absorption, mais aussi aux spectres d'émission. La figure III-6 en donne les spectres d'absorption. Plusieurs transitions $n \rightarrow \pi^*$ dues aux paires d'électrons non liés des atomes d'oxygène et d'azote peuvent contribuer

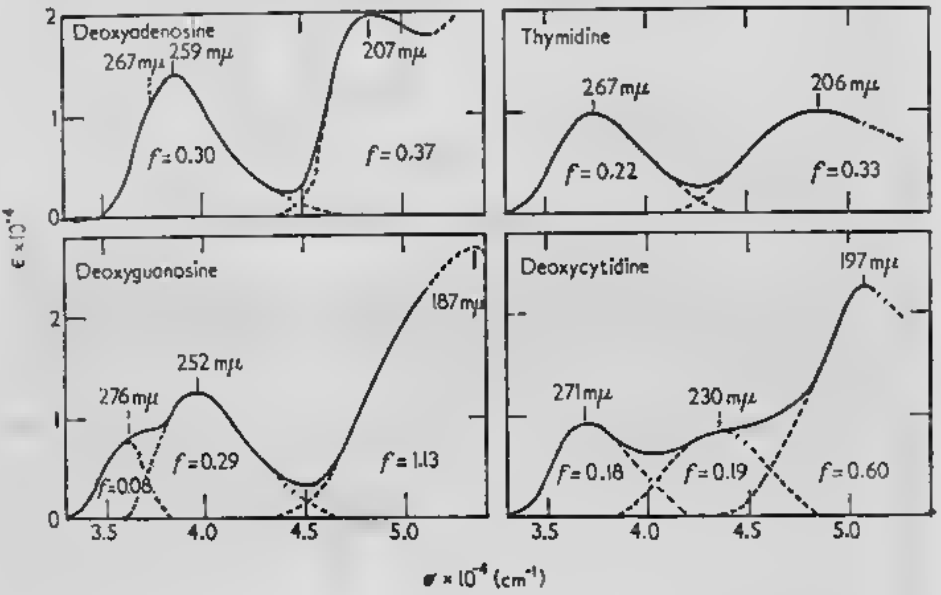


FIG. III-6.

à cette bande d'absorption bien qu'ayant toujours des forces oscillatoires très faibles comparées aux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$. On ne peut les déceler que dans la queue de la bande d'absorption vers les grandes longueurs d'onde.

Les transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, polarisées dans le plan de la molécule, sont responsables, pratiquement, de toute la bande d'absorption à 260 mμ.

Pour les bases et nucléosides pyrimidiques, cette bande correspond à une seule transition.

Pour les bases et nucléosides puriques, qui possèdent les mêmes éléments de symétrie que la purine, il existe deux transitions $\pi \rightarrow \pi^*$, polarisées perpendiculairement, comme le révèle l'étude de la polarisation de fluorescence (28). Ces deux transitions sont nettement séparables dans le spectre d'absorption de la guanosine (fig. III-6). Dans celui de l'adénosine, la deuxième transition apparaît comme un épaulement vers 240 mμ.

D'autre part toutes les bases et tous les nucléosides possèdent vers 200 mμ une bande d'absorption plus intense que celle à 260 mμ et correspondant à une ou plusieurs transitions $\pi \rightarrow \pi^*$ (29).

Les forces oscillatoires des différentes transitions, reportées sur la figure III-6 ont été calculées, à partir des spectres d'absorption, à l'aide de la relation donnée au paragraphe I - B - 1.

La direction des moments de transition a pu être précisée récemment par l'étude en lumière polarisée de l'absorption de monocristaux, dans le cas de l'adénine et de la thymine substituées par un groupement méthyle (30)

Source : MNHN, Paris

(à la place du ribose des nucléosides) (fig. III-7). Ces déterminations expérimentales sont en bon accord avec les prévisions théoriques du paragraphe précédent (31).

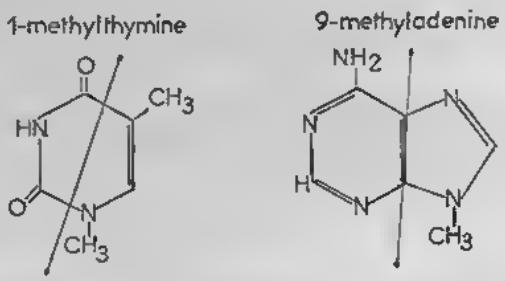


Fig. III-7. — Direction des moments de transition.

L'étude des spectres d'absorption à 77° K en milieu rigide a été entreprise dans le but d'essayer de séparer les différentes transitions responsables de la bande complexe enregistrée vers 260-270 mμ. Ces spectres, réalisés

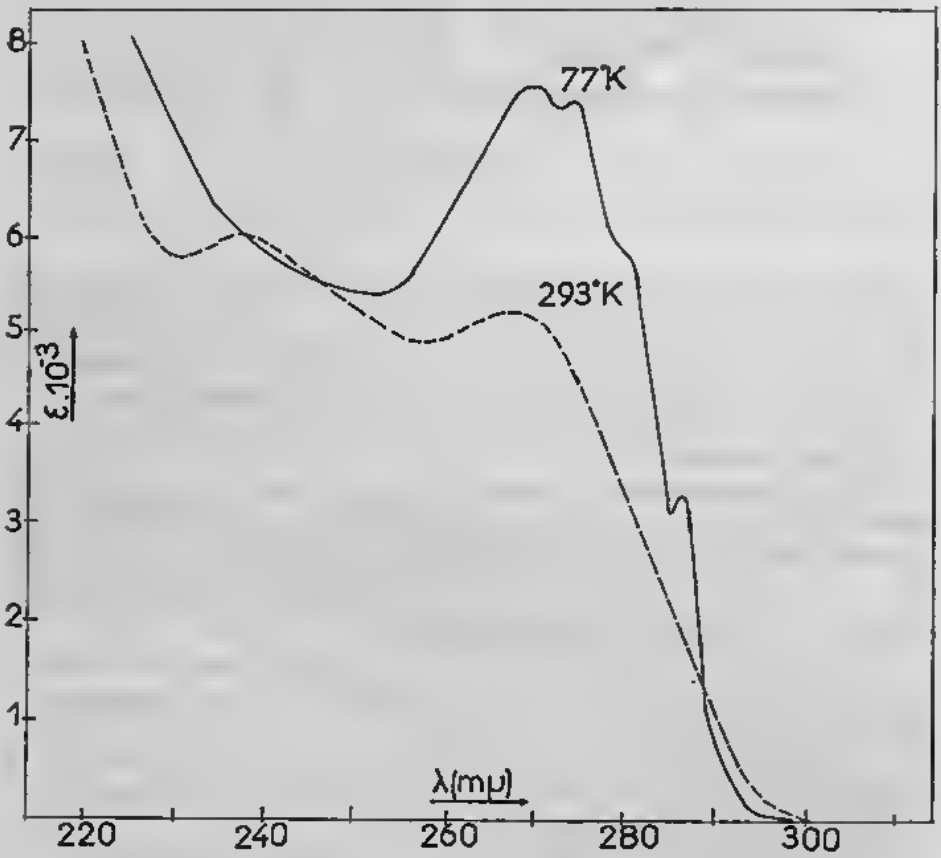


Fig. III-8. — Spectre d'absorption de la cytosine à 293° K et 77° K dans l'E. P. A. $C \simeq 10^{-4}$ M.

Source : MNHN, Paris

dans l'E. P. A., ont seulement permis d'obtenir une structure vibrationnelle de cette bande (fig. III-8; cas de la cytosine), à l'exception de la guanosine. Ils ont cependant l'intérêt de permettre la détermination assez précise de l'énergie du niveau vibrationnel 0 de l'état singulet excité par rapport à celui de l'état fondamental (transition 0 — 0) lorsque le composé étudié est peu ou pas fluorescent.

L'étude des spectres en fonction de la nature du solvant est très limitée par la faible solubilité des composés dans les solvants non aqueux transparents au-dessus de 200 mμ. L'éthanol et l'acétonitrile permettent des concentrations suffisantes pour faire des mesures d'absorption. On observe généralement un déplacement du maximum d'absorption et de faibles variations des coefficients d'extinction. Il est difficile à l'aide de ces seules mesures de distinguer les effets dus aux interactions soluté-solvant et ceux dus au déplacement de l'équilibre entre plusieurs formes tautomères des bases ou nucléosides. La comparaison des spectres d'absorption des différentes formes tautomères, « fixées » par substitution de groupements méthyle aux atomes d'hydrogène en différentes positions, a permis à certains auteurs de conclure à l'existence, en solution aqueuse, d'une seule forme tautomère des bases ou des nucléosides (forme lactame et amine). Cependant d'autres mesures (émission et photochimie) permettent de mettre en évidence des formes tautomères « rares », présentes en très faible proportion, en équilibre avec la précédente (voir Chapitre V). Enfin les spectres d'absorption des nucléosides varient avec le pH de la solution (27) et l'étude de ces spectres permet de déterminer le pK des solutés (voir Chapitre V, paragraphe C - 2 - *a*) (32).

2° Fluorescence.

a) A température ordinaire (20° C), aucune fluorescence n'est observable dans des solutions aqueuses 10^{-3} M des bases et nucléosides (à pH $\simeq$ 6). Une faible fluorescence peut être enregistrée au maximum de sensibilité de l'appareil, pour des concentrations en nucléosides supérieures ou égales à 10^{-2}M. Cette fluorescence est excitée vers 350 mμ et son maximum se situe toujours vers 450 mμ (33). Le spectre d'absorption de ces solutions concentrées révèle la présence d'une faible bande ($\varepsilon \simeq 10$) entre 300 et 350 mμ pour tous les nucléosides (34). Les intensités de cette bande d'absorption et de la fluorescence sont accrues lorsque la viscosité de la solution est accrue par addition de glucose par exemple. Il est probable que la bande d'absorption à 350 mμ et la fluorescence à 450 mμ sont dues à la formation d'agrégats plutôt qu'aux molécules isolées, puisque la fluorescence obtenue est différente de celle observée sur les solutions diluées et congelées (voir paragraphe *b* ci-dessous).

La variation du pH des solutions aqueuses 10^{-3}M des nucléosides ou nucléotides puriques peut entraîner l'apparition d'une fluorescence. En milieu acide $\left(\text{pH} = 1,\ \text{HCl}\,\frac{\text{N}}{10}\right)$, adénosine et guanosine émettent une fluorescence dont le maximum se situe vers 390 mμ pour les deux composés (35). Le rendement quantique de cette fluorescence est très faible (0,003 pour l'adénosine, 0,007 pour la guanosine). Les sites de fixation d'un proton en milieu acide ont été déterminés pour ces deux composés par différentes

Source : MNHN, Paris

méthodes (résonance magnétique nucléaire, infra-rouge, rayons X) : N_1 pour l'adénosine et N_7 pour la guanosine. En milieu basique (pH $\simeq$ 10), la guanine et la guanosine monophosphate (mais ni la guanosine, ni la guanosine triphosphate) donnent naissance à une fluorescence ($\lambda_{max} = 340$ mμ) qui disparaît lorsque le pH dépasse 12. Les pK, mesurés d'après les variations de l'intensité de fluorescence avec le pH, diffèrent peu de ceux déterminés d'après les variations du spectre d'absorption. La purine se comporte comme la guanine : pas de fluorescence de la forme neutre, fluorescence après fixation ou perte d'un proton. Aucune fluorescence n'a été détectée, ni en milieu acide, ni en milieu basique pour la cytidine. Une fluorescence de très faible intensité peut être enregistrée sur des solutions de thymine ou d'uracile en milieu alcalin (pH $\simeq$ 11) (36). L'apparition d'une fluorescence par addition d'un proton sur le noyau purique de la guanosine (en N_7) ou de l'adénosine (en N_1) a été interprétée (35) par une interversion des niveaux singulets excités les plus bas $n \rightarrow \pi^*$ et $\pi \rightarrow \pi^*$. La grande probabilité de conversion singulet $S_1 \rightarrow$ triplet T_1 dans le cas de transitions $n \rightarrow \pi^*$ entraîne généralement l'absence de fluorescence des molécules possédant un niveau singulet excité le plus bas de type $n \rightarrow \pi^*$. Si la paire d'électrons non liés responsable de la transition $n \rightarrow \pi^*$ est fixée par protonation, cette transition est rejetée vers les courtes longueurs d'onde et un état singulet $\pi \rightarrow \pi^*$ peut alors devenir l'état singulet excité le plus bas; d'où l'apparition possible d'une fluorescence. Cependant les transitions $n \rightarrow \pi^*$ sont accompagnées d'un déplacement de la charge négative d'une paire localisée à une orbitale π^* délocalisée. La présence d'une charge positive peut donc favoriser un tel déplacement et un nouvel état $n \rightarrow \pi^*$ (autre que celui correspondant aux électrons n fixés par protonation) peut être le nouvel état singulet excité le plus bas. La molécule ne présentera alors pas de fluorescence en milieu acide.

La perte d'un proton en milieu alcalin a deux effets opposés aux précédents. Une nouvelle paire d'électrons non liés apparaît par enlèvement d'un ion H^+ ce qui entraîne la possibilité d'une nouvelle transition $n \rightarrow \pi^*$. Mais la présence d'une charge négative tend au contraire à défavoriser une telle transition (35).

b) L'étude de la fluorescence en milieu rigide (à 77° K dans l'éthanol ou à 193° K dans des mélanges eau : éthylène glycol 1 : 1 v/v) permet de préciser la nature de l'état singulet excité le plus bas des deux nucléosides puriques. En effet, la purine non substituée, l'adénosine et la guanosine fluorescent dans les conditions ci-dessus (fig. III-9) (38). Le spectre de fluorescence est symétrique de la bande d'absorption de plus grande longueur d'onde par rapport à la transition $0 \rightarrow 0$ qui peut être ainsi déterminée avec une assez bonne précision. Le spectre de fluorescence de l'adénosine à 77° K présente une structure vibrationnelle que ne présente pas celui de la guanosine (la même remarque a déjà été faite à propos des spectres d'absorption à 77° K).

En milieu acide (pH $\simeq$ 1) à 77° K, l'adénosine monophosphate ne fluoresce pas alors que l'on observe une fluorescence en milieu fluide à 293° K. L'intensité de fluorescence du cation de la guanosine est par contre accrue par refroidissement (37). Les mesures de fluorescence à 77° K étant difficiles à réaliser, en particulier à cause de la diffusion très importante, ces résultats doivent être considérés comme qualitatifs.

Source : MNHN, Paris

L'apparition d'une fluorescence à basse température, en milieu rigide, pour les dérivés puriques non ionisés, peut avoir deux origines :

1. La rigidité du milieu, en supprimant les chocs entre les molécules de soluté excitées et les molécules du solvant, diminue la probabilité de désactivation non radiative des premières. La fluorescence peut alors être observée si le niveau singulet excité le plus bas résulte d'une transition $\pi \rightarrow \pi^*$.
2. A 293° K, l'agitation thermique peut également être suffisante pour que les molécules de soluté passent, avant de se désactiver, d'un état $\pi \rightarrow \pi^*$ dans un état $n \rightarrow \pi^*$ d'énergie légèrement supérieure. A basse température, l'état $n \rightarrow \pi^*$ ne pouvant plus être atteint par agitation thermique, la fluorescence ayant son origine dans l'état $\pi \rightarrow \pi^*$ est observée.

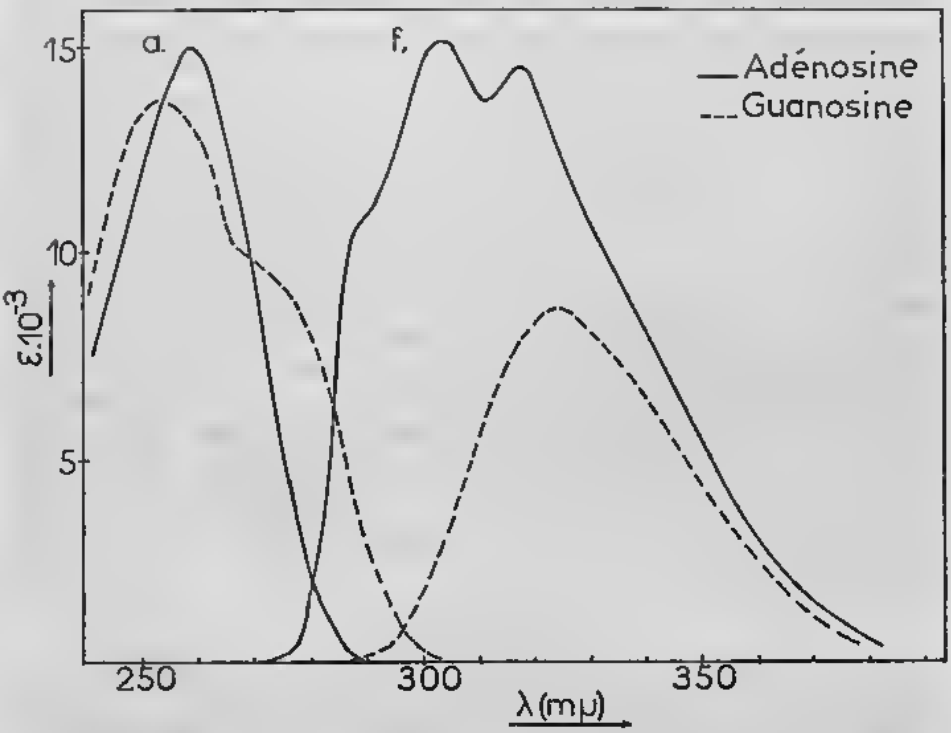


FIG. III-9. — Spectres d'absorption (*a*) et de fluorescence (*f*) des nucléosides puriques à 193° K.

Ces deux explications imposent que l'état singulet excité le plus bas des nucléosides puriques résulte d'une transition $\pi \rightarrow \pi^*$.

L'étude de la polarisation de la fluorescence de la guanine et de l'adénine substituées par un groupement méthyle en N_9 (même position que le ribose dans les nucléosides) a été faite à 193° K dans un mélange eau-éthylène glycol en fonction de la longueur d'onde d'excitation (28). Cette étude permet de mettre en évidence, dans le cas de la guanine, deux bandes dont

Source : MNHN, Paris

les moments sont approximativement perpendiculaires (le rapport de polarisation $\left(\frac{I_{//} - I_{\perp}}{I_{//} + I_{\perp}}\right)$ devient négatif au milieu de la seconde bande). Pour l'adénine, une faible transition polarisée perpendiculairement est observée dans le flanc de la bande d'absorption à 260 mμ, vers les courtes longueurs d'onde. Ces résultats confirment donc les prévisions théoriques, concernant les moments de transition, envisagées au paragraphe A. 1.

B. — ÉTUDE DE L'ÉTAT TRIPLET DES BASES, NUCLÉOSIDES ET NUCLÉOTIDES

La transition $S_0 \rightarrow T_1$ directe étant interdite par les règles de sélection, donc difficile à mettre en évidence par absorption (Chapitre I), l'état triplet des bases, nucléosides et nucléotides peut être peuplé par absorption dans la bande $S_0 \rightarrow S_1$ suivie de la conversion $S_1 \rightarrow T_1$. L'état triplet se désactive radiativement (constante de vitesse k_1) et non radiativement (constante de vitesse k_2). On opère toujours en milieu rigide à 77° K pour éviter la désactivation non radiative par relaxation vibrationnelle, par collisions thermiques avec les molécules de solvant par exemple, et aussi par interactions magnétiques avec des molécules paramagnétiques comme l'oxygène dissous ou des ions des métaux de transition (qui ne peuvent plus diffuser à 77° K). Si l'on veut en outre éviter les interactions entre molécules d'un même soluté à l'état triplet, ou entre une molécule à l'état triplet et une molécule à l'état fondamental, il faut opérer à des concentrations suffisamment faibles (de l'ordre de 10^{-3}M ou inférieures).

La différence entre les énergies des états S_1 et T_1 est suffisamment importante et la température (77° K) suffisamment basse pour que la conversion $T_1 \rightarrow S_1$ par agitation thermique soit nulle (aucune fluorescence différée n'est observée). Toutes les conditions précédentes étant remplies, si on désigne par α le rendement de la transition $S_1 \rightarrow T_1$ et par I l'intensité de la lumière incidente absorbée, la concentration stationnaire $[B_T]$ en molécules B à l'état triplet est donnée par la relation :

$$\alpha\, I = (k_1 + k_2)\,[B_T]$$

Sous excitation continue, on mesure par R. P. E. la concentration stationnaire totale en molécules B à l'état triplet soit $[B_T]$, alors que l'intensité de phosphorescence ne mesure que la proportion de molécules qui se désactivent radiativement, c'est-à-dire :

$$\frac{k_1}{k_1 + k_2}[B_T]$$

Lorsque cesse l'excitation (à l'instant $t = 0$), la concentration $[B_T]$ décroît de façon exponentielle avec le temps :

$$\frac{d\,[B_T]}{dt} = -(k_1 + k_2)\,[B_T]$$

soit

$$[B_T]_t = [B_T]_{t=0} \qquad e^{-(k_1+k_2)\,t}$$

Source : MNHN, Paris

On peut enregistrer le déclin, soit du signal R. P. E., soit de l'intensité de phosphorescence lorsque l'on supprime l'excitation. Les deux temps de vie mesurés sont identiques et égaux à

$$\mathcal{C} = \frac{1}{k_1 + k_2}$$

1° Étude par phosphorescence.

En milieu alcoolique ou dans le mélange eau-propylène glycol 1 : 1 v/v à 77° K, la purine et les nucléosides puriques (adénosine et guanosine) et les nucléotides correspondants sont phosphorescents. Cette phosphorescence peut être caractérisée par son spectre (fig. III-10) et par le temps de vie de l'état triplet phosphorescent (table III-1). Le déclin est parfaitement

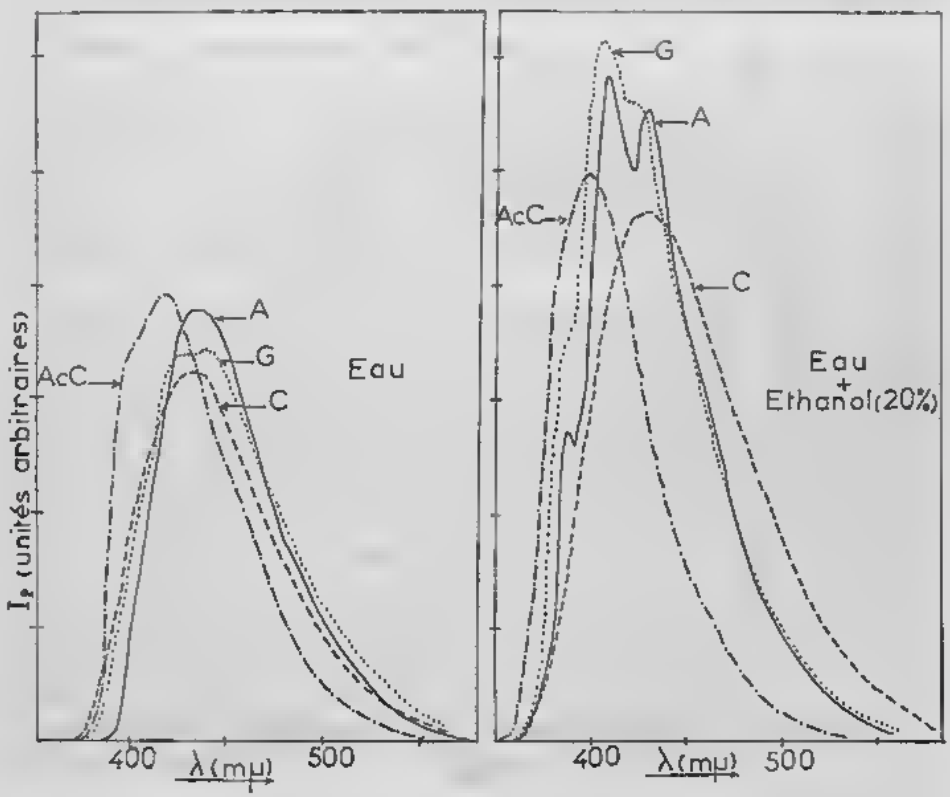


FIG. III-10. — Spectres de phosphorescence de nucléosides.

exponentiel quelle que soit la longueur d'onde d'excitation ou d'émission choisie pour l'enregistrer. Le spectre d'excitation de la phosphorescence est analogue dans tous les cas au spectre d'absorption bien que le faible flux lumineux dans le domaine d'excitation ne permette pas de mesures précises (39, 40).

Le spectre de phosphorescence de l'adénosine et de la purine (comme

Source : MNHN, Paris

celui de fluorescence) présente une résolution vibrationnelle plus prononcée que celui de la guanosine (38).

Bien que les rendements quantiques de phosphorescence soient faibles (2 % environ pour la guanosine et 1 % pour l'adénosine), cette phosphorescence peut être détectée avec des solutions diluées des nucléosides ou nucléotides puriques (10^{-4}M). Par contre les nucléosides et nucléotides pyrimidiques sont peu ou pas phosphorescents. Une phosphorescence de faible intensité peut être détectée à 77° K sur des solutions aqueuses ou alcooliques de cytidine à des concentrations de l'ordre de $5 \cdot 10^{-3}$M (ou supérieures). Le spectre d'excitation de cette phosphorescence est décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre d'absorption et il est donc probable que cette phosphorescence est due, soit à une excitation de type $n \rightarrow \pi^*$, soit à l'existence en solution d'une forme tautomère de la cytosine ou de la cytidine. Quant à l'uridine et à la thymidine, elles donnent une phosphorescence encore plus faible que celle de la cytidine et détectable seulement

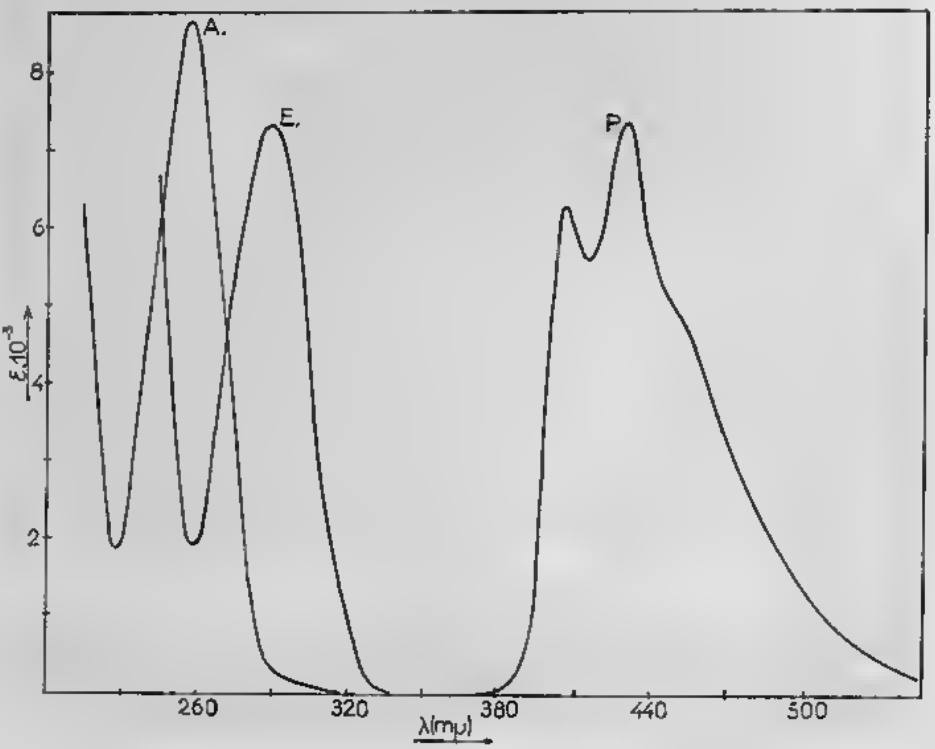
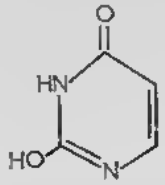


Fig. III-11. — Spectres d'absorption (A), d'excitation (E) et de phosphorescence (P) de l'uracile.

à des concentrations de l'ordre de 10^{-2}M dans l'eau. Alors que la cytosine se comporte du point de vue phosphorescence comme la cytidine, l'uracile a des caractéristiques de phosphorescence distinctes de celles de l'uridine. Le spectre de phosphorescence est différent (fig. 11I-11) et le temps de vie de l'état phosphorescent de l'uracile est inférieur à $8\ 10^{-2}$ s alors que celui de l'uridine est environ 0,5 s. Le 1-méthyl-uracile se comporte comme l'uridine

Source . MNHN, Paris

ce qui exclut la participation du ribose. L'étude des spectres d'absorption révèle dans les solutions aqueuses 10^{-4}M d'uracile la présence d'une faible bande vers 300 mμ; cette bande n'existe pas pour des solutions aqueuses 10^{-4}M d'uridine ou de 1-méthyl-uracile. Le maximum d'excitation de la phosphorescence de l'uracile est situé aux environs de 300 mμ. Il semble donc que la phosphorescence de l'uracile soit due à l'existence, en solution aqueuse, d'une faible proportion de forme tautomère, la tautomérie impliquant l'azote N_1. La 2,4-diméthoxy-pyrimidine ayant des caractéristiques de phosphorescence différentes de celles de l'uracile, la forme tautomère de l'uracile responsable de la phosphorescence pourrait être la 2-hydroxy-4-pyrimidone.



Le temps de vie très court ($<8\ 10^{-2}$ s) peut s'expliquer par l'existence d'un triplet $n \rightarrow \pi^*$, les électrons n impliqués étant ceux de N_1. Les états triplets $n \rightarrow \pi^*$, en raison du couplage spin-orbite important, ont en général un temps de vie très court (de l'ordre de 10^{-3} s) même en milieu rigide à 77° K.

Variation des caractéristiques de phosphorescence des nucléosides avec le pH.

Le pH est déterminé pour les solutions aqueuses à 20° C. Ensuite, pour obtenir un milieu transparent à 77° K, les solutions aqueuses sont diluées avec du propylène glycol (1 v/1 v). On constate ainsi qu'en milieu acide (pH $\simeq$ 1) la purine et les dérivés de l'adénine (adénosine : pK = 3,6) ne présentent plus de phosphorescence alors que les dérivés de la guanine (guanosine : pK = 2,2) présentent une phosphorescence différente de celle enregistrée sur la molécule neutre (pH $\simeq$ 7) (tables III-1 et III-2) (41). Le spectre de phosphorescence est déplacé vers les courtes longueurs d'onde et le temps de vie est plus court (0,27 s au lieu de 1,2 s). En milieu alcalin (pH $\simeq$ 11), la guanosine (pK = 9,4) n'est pas phosphorescente. L'intensité de phosphorescence de la cytidine (pK = 4,2) en milieu acide est encore plus faible (environ 4 fois) que celle en milieu neutre. En milieu basique (pH $\simeq$ 12), l'uridine (pK = 9,5) donne une phosphorescence ayant son maximum vers 420 mμ et dont le temps de vie est $\tau = 0{,}5$ s. La thymidine (5-méthyl uridine) se comporte comme l'uridine ($\lambda_{max} = 445$ mμ; $\tau = 0{,}4$ s à pH $\simeq$ 12).

2° Étude par résonance paramagnétique électronique.

Comme il a été expliqué au chapitre II, les spectres de R. P. E. enregistrés à 77° K sont les dérivées des courbes d'absorption et les transitions observées sont les transitions dites « $\Delta m = 2$ ». La résonance correspondant à l'état triplet est caractérisée par la valeur du champ minimum $H_{min.}$, valeur dont on peut déduire une mesure globale de l'interaction entre les deux électrons optiques en champ nul :

$$(D^2 + 3E^2)^{1/2} = D^* = [3/4\ (h\nu)^2 - 3\ (g\beta\ H_{min.})^2]^{1/2}.$$

Source : MNHN, Paris

Alors que la résonance de l'état triplet est assez facilement détectée sur la purine et les nucléosides puriques en solution dans l'éthanol ou dans le mélange eau : propylène glycol 1 : 1 v/v (voir figure IV-7 et table III-I), aucune résonance n'a pu être détectée pour les nucléosides pyrimidiques dans ces solvants, ce qui confirme les résultats enregistrés par l'étude de la phosphorescence. L'état triplet des nucléosides pyrimidiques est trop peu peuplé pour qu'il soit possible de le détecter par R. P. E. (41).

La valeur de $H_{min.}$ pour la guanosine en milieu acide (pH $\simeq$ 1) diffère de celle pour la guanosine n'ayant pas fixé de proton (pH $\simeq$ 6) tout comme le spectre de phosphorescence et le temps de vie de l'état triplet (III-B-I).

Une résonance peut être détectée à de très basses valeurs du champ pour l'uridine et la thymidine en milieu basique (eau + ammoniaque N) à 77° K. Nos résultats sont en bon accord avec ceux de SHULMAN et collaborateurs (42) (table III-I). Dans les conditions utilisées (milieu basique), l'uridine et la thymidine ont perdu leur proton N_3. Cependant, la 1,3-diméthylthymine et la 3-méthylthymidine, qui ne peuvent perdre de proton, donnent également un signal de résonance de l'état triplet dans le même domaine de valeurs du champ. Ces résultats montrent que l'ionisation n'est pas nécessaire pour observer le signal de résonance de l'état triplet. L'apparition de ce signal en milieu basique pour l'uridine et la thymidine est sans doute due à un effet d'environnement (voir paragraphe C-2 ci-dessous et paragraphe A-4 du chapitre IV).

Nous avons déjà vu que les caractéristiques de phosphorescence de la thymidine ($\lambda_{max.} = 445$ mμ ; $\tau = 0{,}4$ s) différaient de celles de l'uridine ($\lambda_{max.} = 420$ mμ ; $\tau = 0{,}5$ s). La grande valeur du paramètre D* calculée à partir des valeurs de $H_{min.}$ (voir II-B-3) montre que le couplage entre les électrons dans l'état triplet est important, ce qui suggère que l'état triplet dans ces deux nucléosides est localisé au voisinage de la double liaison 5-6. La substitution d'un méthyle en position 5, quand on passe de l'uridine à la thymidine, entraîne les modifications observées des caractéristiques de l'état triplet. Cette localisation de l'état triplet revêt une importance considérable puisque les réactions photochimiques essentielles de ces nucléosides (hydratation et dimérisation) impliquent cette double liaison 5-6.

C. — INFLUENCE DES SUBSTITUTIONS, DE L'ÉTAT PHYSIQUE ET DES INTERACTIONS AVEC LE SOLVANT SUR LES PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DES COMPOSANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES

1° Étude de dérivés substitués.

L'étude de la substitution des bases et nucléosides pyrimidiques a été entreprise dans le but de conférer à ces composés des propriétés émissives aisément détectables, car (nous l'avons vu au § III-B) les composants pyrimidiques des acides nucléiques ne possèdent pas ces propriétés. En particulier, le but essentiel a été de peupler suffisamment leur état triplet pour le détecter par phosphorescence et par R. P. E.

Source : MNHN, Paris

a) *Acétylation ou benzoylation des groupements NH_2.*

L'acétylation ou la benzoylation du groupement NH_2 de la cytidine entraînent un déplacement du spectre d'absorption vers les grandes longueurs d'onde et l'apparition de propriétés émissives et de R. P. E. caractéristiques (fig. III-12 et table III-1). Étant donné leur plus grande facilité de cristallisation (donc de purification), les composés de référence ont été les dérivés acétylé ou benzoylé de la 1-méthylcytosine (au lieu de la cytidine). Mais l'étude comparée de la 1-méthyl-N_4-acétylcytosine et de la N_4-acétylcytidine, par exemple, montre que les caractéristiques de fluorescence (spectre et rendement quantique) et de phosphorescence (spectre, rendement quantique et temps de vie) sont identiques. Le rendement quantique de phosphorescence de la 1-méthyl-N_4-acétyl cytosine est environ 0,1. Il faut aussi remarquer que, bien que son niveau singulet excité le plus bas ait une énergie plus faible que celui de la cytidine, l'inverse est vrai pour les états triplets.

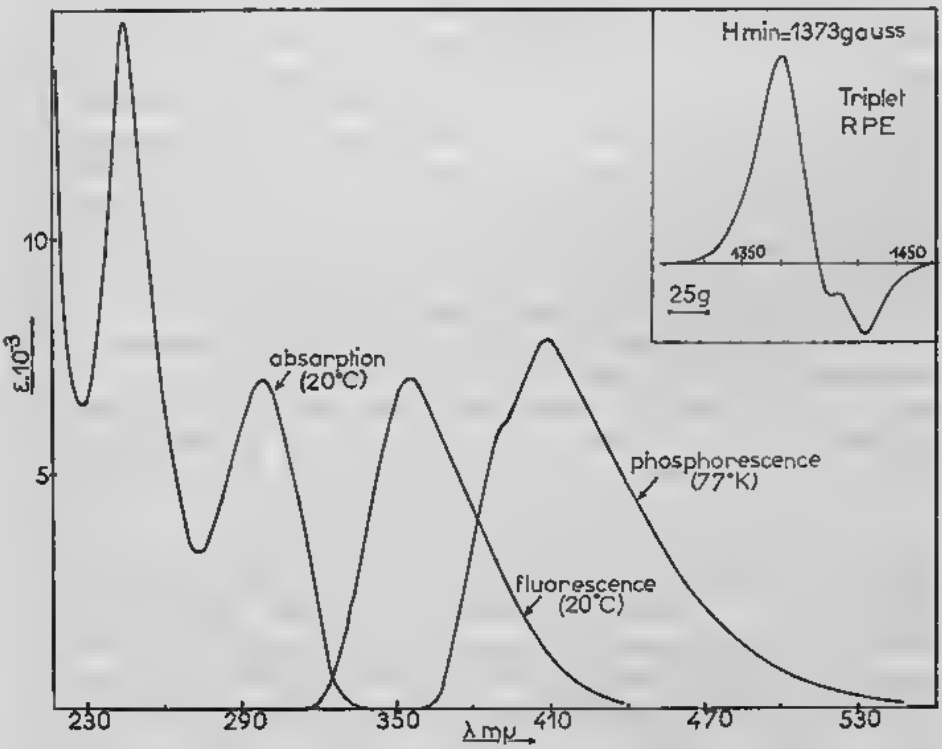


FIG. III-12. — Caractéristiques spectrales de la 1-méthyl-N_4-acétylcytosine (AcC).

La benzoylation du groupement NH_2 de l'adénosine entraîne une augmentation considérable de la population de l'état triplet sans en modifier de façon essentielle l'énergie et le temps de vie (table III-1).

Source : MNHN, Paris

b) *Dérivés halogénés.*

La présence d'un atome lourd, par exemple un halogène, dans une molécule augmente le couplage spin-orbite et de ce fait doit entraîner une conversion $S_1 \rightarrow T_1$ plus rapide.

Les dérivés testés sont le résultat de la substitution de l'atome d'hydrogène en position 5 par un halogène. Parmi ceux-ci, seule la 5-bromo-cytidine (la 5-bromocytosine donnant les mêmes résultats) donne une fluorescence et une phosphorescence aisément détectables ($\lambda_{max.}$: abs. 293 mμ ; fluor. 350 mμ ; phos. 450 mμ ; $\mathcal{C}p < 0{,}085$ s). Le 5-bromouracile ($\lambda_{max.} = 275$ mμ) donne en solution aqueuse une phosphorescence de très faible rendement quantique, mais située à des longueurs d'onde beaucoup plus grandes que celle de l'uracile et dont le spectre présente une structure vibrationnelle très prononcée.

c) *Dérivés deutérés.*

La deutération partielle des bases et nucléosides a été réalisée par simple dissolution dans l'eau lourde D_2O, les atomes H mobiles des molécules du soluté s'échangeant avec les atomes D de l'eau lourde. Cet échange peut être mis en évidence par résonance magnétique nucléaire (R. M. N.) : par exemple le spectre R. M. N. de la cytidine se compose, dans un solvant tel que le diméthylsulfoxyde, des raies dues aux deux protons attachés en C_5 et C_6 (2 doublets), aux 5 protons du ribose et aux deux du groupement NH_2. En solution dans D_2O, on observe une bande d'absorption intense due aux protons de l'eau, l'intégration montrant que cette bande correspond à 5 protons qui ont été ainsi échangés avec des atomes D (trois des groupements OH du ribose, deux du groupement NH_2). En dehors de cette bande due à l'eau, on n'observe plus que les deux doublets des protons C_5 et C_6 et les deux singulets dus aux protons attachés en C'_1 et C'_4.

La substitution d'atomes D aux atomes H mobiles a pour effet, sur tous les composés testés, d'augmenter l'intensité de phosphorescence et le temps de vie de l'état triplet pbosphorescent (table III-1). Ces deux grandeurs sont multipliées par un coefficient qui est le même en première approximation. Il est impossible de faire des mesures de fluorescence à 77° K dans D_2O. Cependant, en absorption, on ne note aucune différence ni des $\lambda_{max.}$, ni des coefficients d'extinction. La deutération ne joue sans doute pas de rôle dans la conversion $S_1 \rightarrow T_1$ (43). Par contre, cette deutération diminue la vitesse de désactivation non radiative à 77° K (44) (interaction vibrationnelle). La concentration stationnaire en état triplet et le temps de vie de cet état triplet s'en trouvent donc augmentés. Une substitution complète de tous les atomes H des bases et nucléosides par des atomes D serait évidemment souhaitable pour accentuer le phénomène.

2° Influence de l'état physique et des interactions avec le solvant.

a) *Phosphorescence des poudres microcristallines de nucléosides.*

Les poudres qui ont été utilisées sont les produits cristallisés commerciaux. Une recristallisation a été effectuée pour la cytidine à partir de solutions concentrées dans le diméthylsulfoxyde et évaporées à des températures inférieures à 50° C. Les résultats obtenus sont identiques après

Source : MNHN, Paris

comme avant la recristallisation. Les autres composés n'ont été soumis à aucune recristallisation. Le comportement des poudres microcristallines est essentiellement différent de celui des solutions. Alors que les nucléosides puriques en solution congelée à 77° K sont phosphorescents, aucune phosphorescence n'est détectable sur les poudres à 77° K. Au contraire les bases et les nucléosides pyrimidiques, peu ou pas phosphorescents en solution, donnent sous forme de poudre une émission de phosphorescence qui est en réalité, dans la plupart des cas, la superposition de deux phosphorescences de spectres et temps de vie différents (fig. III-13, cas de la cytosine). L'une de ces phosphorescences a des caractéristiques voisines de celle enregistrée sur les solutions; on peut donc l'attribuer à la molécule isolée. L'autre phosphorescence pourrait être due à des agrégats de molécules. L'extinction de la phosphorescence des nucléosides puriques, lorsque l'on passe des solutions aux poudres, est sans doute due à la formation de complexes par

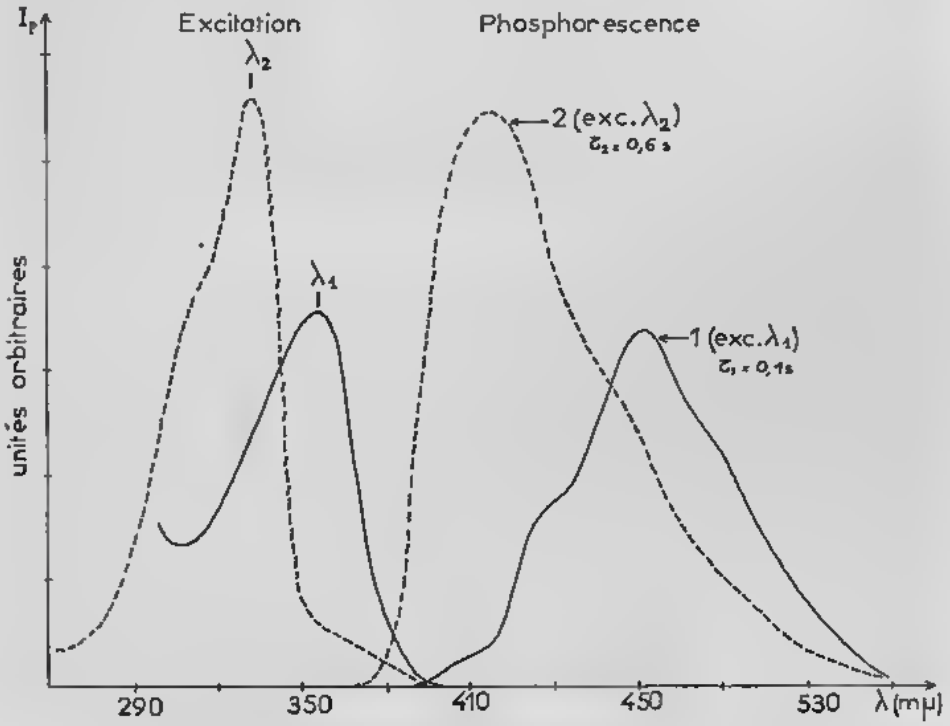


Fig. III-13. — Phosphorescence de la cytosine en poudre à 77° K.

liaisons H intermoléculaires (voir Chapitre IV, paragraphe C 1 et 2). L'acide polyadénylique (poly A) qui a une structure en simple hélice en solution aqueuse à pH 7 a les mêmes caractéristiques de phosphorescence que le mononucléotide dans des conditions identiques. La disparition de la phosphorescence n'est donc pas due à un empilement des bases. Mais en milieu acide (pH 5) quand la moitié environ des noyaux A du poly A sont protonés, une double hélice est obtenue (45), par formation de liaisons hydrogène qui entraînent la disparition à la fois de la fluorescence et de la phosphorescence.

Source : MNHN, Paris

b) *Interactions soluté-solvant.*

Les solutions aqueuses des nucléosides puriques congelées à 77° K sont phosphorescentes. Quand on ajoute des proportions croissantes d'éthanol à ces solutions aqueuses, en conservant constante la concentration en nucléoside, on constate que le temps de vie de l'état triplet phosphorescent et l'intensité de phosphorescence augmentent et que simultanément le spectre de phosphorescence se déplace vers les courtes longueurs d'onde et acquiert une structure vibrationnelle. Cette évolution s'arrête et les caractéristiques de phosphorescence ne varient plus à partir d'une certaine concentration en éthanol. Ainsi pour des solutions $2 \cdot 10^{-3}$M d'adénosine, le temps de vie passe de 2,3 s à 2,9 s et l'intensité de phosphorescence est multipliée par un facteur 3 dès que le solvant contient 5 % d'éthanol (fig. III-14). Au-delà de 5 % d'éthanol, les caractéristiques de phosphorescence ne varient pratiquement pas jusqu'à 25 % d'éthanol, une légère diminution de l'intensité de phosphorescence ayant lieu au-delà de 25 %. Les résultats sont encore plus nets avec la purine non substituée. L'addition de 1 % d'éthanol à une solution aqueuse multiplie l'intensité de phosphorescence par un facteur 20 et produit un déplacement hypsochrome du spectre de phosphorescence. Intensité et spectre ne varient plus ensuite quelle que soit la concentration en éthanol (> I %) (fig. III-15). Par contre le temps de vie de l'état triplet de la purine est peu affecté par l'addition d'éthanol (il passe de I,6 à 1,8 s).

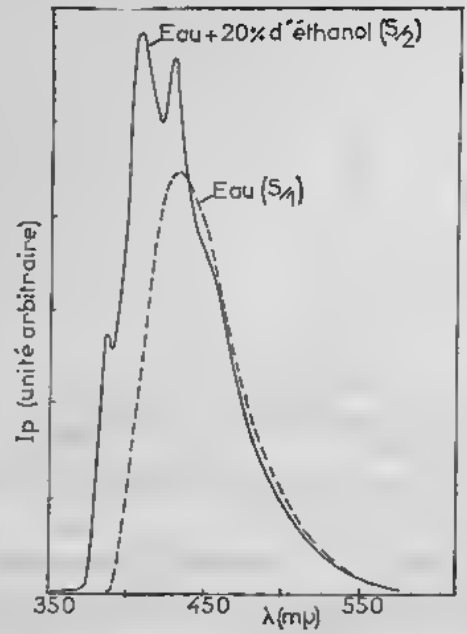


FIG. III-14. — Spectres de phosphorescence de l'adénosine $c = 3. 10^{-3}$ M.

Un phénomène analogue est observable sur une solution aqueuse $5 \cdot 10^{-3}$M de cytidine pour laquelle l'addition de 5 % d'éthanol entraîne une augmentation de l'intensité de phosphorescence (multipliée par un facteur 2) et

Source : MNHN, Paris

un déplacement hypsochrome du spectre de phosphorescence. Les résultats sont analogues à ceux obtenus sur des solutions de benzophénone dans le mélange méthylcyclobexane-isopentane (1 : 1 v/v) lorsque l'on ajoute des proportions croissantes d'éthanol (l'addition de 1 % d'éthanol entraîne une multiplication de l'intensité de phosphorescence par un facteur 20 et un déplacement du spectre de phosphorescence vers les courtes longueurs d'onde) (46). Ces résultats obtenus sur la benzophénone ont été interprétés par la formation de liaisons H, benzophénone-éthanol, les molécules de benzophénone n'ayant pas d'interactions, ni entre elles (en solution diluée), ni avec les solvants méthylcyclohexane et isopentane. Dans la congélation de solutions aqueuses il est probable que, dans la plupart des cas, les molécules du soluté sont exclues du réseau cristallin de la glace. L'étude de réactions ioniques bimoléculaires en solution aqueuse (47) montre par exemple que la vitesse de ces réactions est plus grande à — 10° C qu'à 20° C (sauf si l'une des molécules réagissantes est l'eau, auquel cas la réaction s'arrête). Ceci s'explique par un effet de concentration, les molécules des deux solutés étant sans doute beaucoup plus proches dans les cavités du réseau de la glace qu'en solution fluide. De même la dimérisation photochimique de la thymine en solution aqueuse congelée (48) a été interprétée par la formation d'agrégats de molécules de thymine dans des cavités du réseau cristallin de la glace (même à des concentrations de 10^{-4}M). La dimérisation ne se produit pas en milieu fluide. Elle n'a pas lieu non plus si on ajoute 2 % d'éthanol à la solution avant de la congeler. Les résultats enregistrés en phosphorescence peuvent s'interpréter à l'aide de ces deux considérations. En solution aqueuse congelée à 77° K, les molécules de soluté (purine ou nucléosides) sont exclues du réseau cristallin de la glace et n'ont ainsi pas ou peu d'interaction avec les molécules d'eau, mais forment certainement des agrégats. Lorsque l'on ajoute de l'éthanol, les molécules d'éthanol jouent le rôle d'un deuxième soluté. Il peut alors s'établir des liaisons hydrogène entre purine (ou nucléoside) et éthanol et les agrégats sont détruits. Le déplacement vers les courtes longueurs d'onde (environ 5 mμ) du maximum du spectre d'excitation de phosphorescence à 77° K peut être attribué à la disparition des agrégats. L'apparition de liaisons hydrogène entraîne l'augmentation de l'intensité de phosphorescence, le déplacement vers les courtes longueurs d'onde du spectre de phosphorescence et l'apparition de la structure vibrationnelle. A 20° C, les spectres d'absorption sont pratiquement identiques dans l'eau et dans l'éthanol, car en milieu fluide les molécules du soluté peuvent former le même type de liaisons hydrogène avec les deux solvants.

La destruction des agrégats peut être réalisée par addition de sels (47). C'est ainsi que l'addition de chlorure de sodium 0,5 M à des solutions aqueuses de purine, adénosine, et guanosine avant de congeler à 77° K, entraîne une augmentation considérable de la phosphorescence. Comparée à celle de la solution aqueuse correspondante, l'intensité de phosphorescence est multipliée par 22 pour la purine, 6 pour l'adénosine et 10 pour la guanosine. L'effet des sels peut être expliqué d'une manière analogue à celui de l'éthanol. Il est probable que les cations solvatés sont exclus du réseau cristallin avec les molécules du soluté. Des liaisons hydrogène peuvent alors se former entre ces molécules du soluté et les molécules d'eau et empêchent la formation des agrégats.

Source : MNHN, Paris

L'étude des variations de l'intensité du signal R. P. E. de l'état triplet, quand la concentration en éthanol ou en sel augmente, montre que la population de l'état triplet et l'intensité de phosphorescence varient de la même façon. La figure III-15 donne les variations de ces deux grandeurs pour la purine. On peut en conclure que la forte augmentation du rendement de phosphorescence par destruction des agrégats est le résultat d'une augmentation de la probabilité de conversion $S_1 \rightarrow T_1$ (" intersystem-crossing "). Les faibles variations du temps de vie de l'état triplet sont en accord avec cette interprétation.

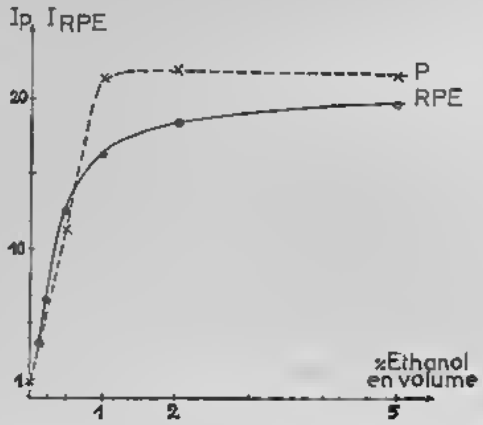


FIG. III-15. — Variations des intensités de phosphorescence et du signal R. P. E. à 77° K de l'état triplet de la purine ($c = 10^{-3}$ M; solvant H_2O).

D. — CONCLUSION

NATURE ET ÉNERGIE RELATIVE DES NIVEAUX D'ÉNERGIE EXCITÉS SINGULET ET TRIPLET LES PLUS BAS DES NUCLÉOSIDES.

La fonction d'onde d'un état triplet perturbé peut être représentée par une combinaison linéaire de la fonction d'onde de l'état triplet non perturbé Ψ^o_T et d'une ou plusieurs fonctions d'onde singulet Ψ_s (paragraphe I-B-4).

$$\Psi_T = \Psi^o_T + \lambda \Psi_s$$

Si λ était égal à 0, c'est-à-dire si l'état triplet n'était pas perturbé, la transition radiative $T_1 \rightarrow S_0$ n'aurait pas lieu et l'on n'observerait pas de phosphorescence. Pour un état triplet $\pi - \pi^*$, λ est généralement faible en l'absence d'interactions dues à la présence d'atomes lourds. Le temps de vie de cet état est alors assez long (jusqu'à plusieurs secondes). Par contre, λ est toujours important pour un état triplet $n - \pi^*$ ce qui entraîne un temps de vie court (de l'ordre de 10^{-3} s).

Source : MNHN, Paris

D'autre part, STERNLICHT a montré que les valeurs du paramètre D, mesuré par R. P. E. et défini au chapitre II, sont beaucoup plus grandes pour les états triplets $n \rightarrow \pi^*$ que pour les états $\pi \rightarrow \pi^*$ pour lesquels on observe des valeurs de $0{,}1 - 0{,}2$ cm^{-1}. Les résultats enregistrés sur les nucléosides puriques et pyrimidiques, aussi bien par phosphorescence que par R. P. E., montrent donc que leur état triplet est sans équivoque possible de type $\pi \rightarrow \pi^*$ quelle que soit la transition $S_0 \rightarrow S_1$ ($n \rightarrow \pi^*$ ou $\pi \rightarrow \pi^*$) qui lui a donné naissance. L'émission de phosphorescence est donc polarisée perpendiculairement au plan des bases. Cette dernière propriété a été récemment vérifiée expérimentalement pour la purine et certains de ses dérivés (97). La phosphorescence est polarisée perpendiculairement à l'excitation quelle que soit la longueur d'onde d'excitation choisie.

Dans l'étude du transfert de l'énergie d'excitation optique, le facteur le plus important à considérer est la position relative des niveaux d'énergie mis en jeu par les différentes molécules impliquées dans ce transfert. Dans le tableau III-2 sont résumées les caractéristiques d'absorption et d'émission décrites précédemment. De ces mesures ont été déduites les énergies de l'état singulet excité le plus bas S_1 et de l'état triplet le plus bas T_1.

Dans les cas où absorption et fluorescence ont pu être enregistrées, l'énergie de l'état S_1 a été obtenue par l'intersection des deux spectres. Quand seule l'absorption est accessible à l'expérience, l'énergie correspondant à l'état S_1 a été déterminée par l'intersection avec l'axe des abscisses de la tangente au point d'inflexion de la dernière bande d'absorption vers les grandes longueurs d'onde. Cette opération, réalisée dans les cas où la fluorescence est mesurable, montre que la valeur obtenue est pratiquement la même que celle déterminée par l'intersection des spectres d'absorption et de fluorescence. L'énergie des états triplets est beaucoup plus difficile à déterminer avec précision en l'absence des spectres d'absorption $S_0 \rightarrow T_1$. Cependant l'ordre relatif des énergies est valable. Ainsi l'énergie du premier état singulet excité S_1 des nucléosides décroît dans l'ordre :

$$A > U > T > C > G.$$

Pour l'état triplet, il faut distinguer deux cas : soit que les molécules de nucléosides forment des agrégats (comme dans les solutions aqueuses congelées à 77° K); soit que ces molécules n'admettent d'interactions qu'avec le solvant (comme dans les solvants donnant des verres transparents à 77° K). Dans le premier cas (agrégats), l'ordre de succession des énergies des états triplets est le suivant (voir chapitre IV, paragraphe A-4) :

$$C > G > A > U > T.$$

Dans le second cas (pas d'interactions soluté-soluté), cet ordre devient :

$$G > A > C, U > T.$$

L'ordre de succession des énergies des états triplets est le facteur essentiel déterminant l'efficacité du transfert triplet-triplet (voir chapitre IV).

Source : MNHN, Paris

TABLE III-1

Composés	Temps de vie de phosphorescence (*s*)			$H_{min.}$ (gauss) Éthanol ou eau + propylène glycol (1 : 1v/v) $\nu = 9218$ Mc/s	$\sqrt{D^2 + 3E^2} = D^*$ (cm^{-1})
	H_2O	D_2O	Éthanol		
Purine	1,6			1354	0,154
Adénosine	2,3	2,6	2,9	1430	0,132
Guanosine	1,2	1,3	1,45	1380	0,145
Guanosine(+) (pH 1) . .	0,27				0,126*
Cytidine	0,55	0,8	0,7	—	—
Uridine	0,5	0,7		—	—
Uridine(−) (pH 11). . .	0,5				0,163*
Thymidine(−) (pH 11) .	0,4			1089	0,199
1,3-diméthylthymine. .	0,5			1146	0,193
N_6-benzoyladénosine . .			1,5	1440	0,129
N_4 - acétyl - 1 - méthyl-cytosine			0,31	1373	0,147
N_4 - benzoyl - 1 - méthyl-cytosine			0,2	1405	0,139

* SHULMAN et al. (41,42).

Source : MNHN, Paris

TABLE III-2

Composés	λ max. (mμ) absorption	λ max. (mμ) fluorescence	Énergie du 1er état singulet excité (cm^{-1})	λ max. (mμ) phosphorescence à 77° K	Énergie de l'état triplet le plus bas (cm^{-1}) à 77° K	
					Éthanol	H_2O
Adénosine éthanol.	260	310 (77° K)	35 600	385, 405, 425, 450(ep)	26 800	25 400
Adénosine H_2O-pH 1. . . .	258	390 (20° C)	35 200	—	—	—
Guanosine éthanol.	252, 276 (ep)	325 (77° K)	33 800	380 (ep), 410	27 050	26 050
Guanosine H_2O-pH 1 . . .	257, 280 (ep)	385 (20° C)	32 800	380 (ep), 400		27 800
Guanosine H_2O-pH 11. . .	255, 270	340 (20° C)	34 500	—	—	
Cytidine H_2O-pH 6	271	—	33 900	425	26 700	26 400
Cytidine H_2O-pH 1	280	—	32 900	—	—	—
Thymidine H_2O-pH 6 . . .	276	—	34 150	470		24 600
Thymidine H_2O-pH 12. . .	267	—	34 400	445		25 800
Uridine H_2O-pH 6	262	—	34 750	450		25 300
Uridine H_2O-pH 12	261	—	35 100	425		26 650

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

CHAPITRE IV

INFLUENCE DES INTERACTIONS ENTRE LES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES SUR LEURS PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES

La nature des interactions entre les bases dans les acides nucléiques peut être précisée par l'étude du transfert de l'énergie d'excitation optique (Chap. I). Par exemple, la mise en évidence d'un transfert triplet-triplet est une preuve de l'existence de forces d'échange électronique entre les deux partenaires. Une étude rigoureuse et claire de ces phénomènes nécessite l'utilisation de modèles simples. Les oligonucléotides offrent, de ce point de vue, un champ de recherche suffisamment vaste et relativement simple : d'une part ces oligonucléotides possèdent, en solution, une structure secondaire annonçant les polynucléotides et les acides nucléiques; d'autre part, leur séquence étant connue par synthèse, l'interprétation des résultats obtenus est moins complexe que dans le cas des acides nucléiques ou des polynucléotides. Les dinucléotides constituent le matériel de choix pour étudier le transfert de l'énergie d'excitation optique entre bases superposées.

A. — ÉTUDE DU TRANSFERT DE L'ÉNERGIE D'EXCITATION OPTIQUE DANS LES DINUCLÉOTIDES ET TRINUCLÉOTIDES MIXTES ET ENTRE NUCLÉOSIDES DANS LES SOLUTIONS AQUEUSES CONGELÉES

Ce sont les interactions entre les bases, dues à l'empilement et non à la formation de liaisons hydrogène, qui sont responsables de l'hypochromisme et de la dispersion optique rotatoire (25). Les interactions de type excitonique devraient entraîner un déplacement des maximums d'absorption (Chapitre I). Mais l'hypo- ou l'hyperchromie, c'est-à-dire la différence entre le spectre d'absorption du dinucléotide et le spectre du mélange équimoléculaire correspondant, ne permet pas de déterminer le rôle éventuel de cette interaction excitonique. De toutes façons, lorsque les bases d'un dinucléotide ont leurs niveaux singulets excités les plus bas assez distants en énergie (comme par exemple A et G, A et C, U et G...), il est difficile de penser qu'une interaction de type excitonique puisse avoir lieu à ce niveau.

L'étude du transfert d'énergie par fluorescence est évidemment considérablement restreinte par l'absence de fluorescence des nucléosides puriques et pyrimidiques à température ordinaire sous leur forme neutre (c'est-à-dire n'ayant ni fixé ni perdu de proton). Certains nucléosides deviennent fluorescents en milieu acide ou basique (Chapitre III). Mais l'utilisation de ces milieux est très limitée puisque la structure secondaire du dinucléotide y est souvent détruite et que le dinucléotide s'hydrolyse.

Source : MNHN, Paris

Les mesures de fluorescence sont rendues difficiles par l'utilisation de basses températures. Cependant, on peut dire que ces mesures montrent, en première approximation, que le spectre de fluorescence des dinucléotides à 77° K est la superposition des spectres de fluorescence des deux nucléotides. Ces résultats semblent donc montrer que les états singulets excités les plus bas des nucléosides sont peu affectés dans le dinucléotide (ce qui exclut une interaction de type excitonique) et qu'il n'y a pas de transfert entre eux (transfert type FÖRSTER). Ces conclusions sont évidemment données avec beaucoup de réserves par suite de l'imprécision des mesures. Cependant l'étude du transfert par phosphorescence et par R.P.E. (*vide infra*) confirme que ce transfert se fait essentiellement entre états triplets et n'implique pas les états singulets.

1° Théorie du transfert triplet-triplet.

Le transfert de l'énergie d'excitation électronique d'une molécule D (donneur), dans son état triplet, à une molécule A (accepteur), dans son état fondamental, peut se schématiser par l'équation :

$$D_{T_1} + A_{S_0} \rightarrow D_{S_0} + A^*_{T_1}$$

où les indices S_0 et T_1 indiquent que les molécules sont dans leur état singulet fondamental (S_0) ou leur état triplet le plus bas (T_1). Le transfert se fait de façon non ambiguë entre niveaux triplets lorsque les niveaux d'énergie des deux partenaires occupent la disposition relative représentée sur la

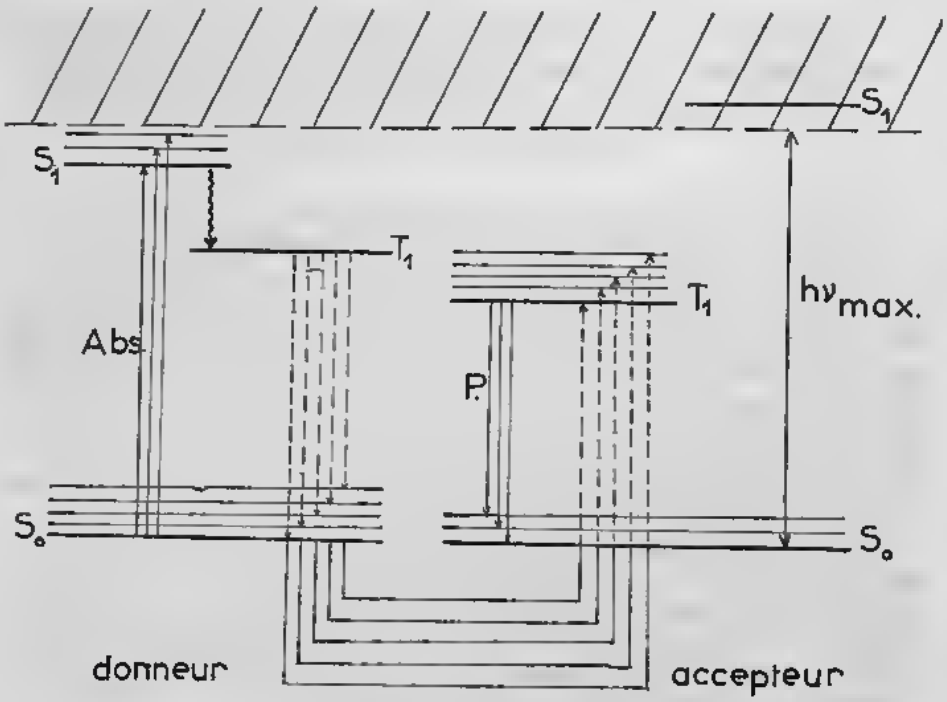


FIG. IV-1. — Transfert d'énergie triplet-triplet.

Source : MNHN, Paris

figure IV-1. Dans ces conditions, on peut en effet exciter de façon sélective les molécules du donneur sans que les molécules d'accepteur absorbent elles-mêmes d'énergie et étudier la phosphorescence de cet accepteur (18).

a) *Étude des états stationnaires.*

Le transfert, caractérisé par sa constante de vitesse k_3, entraîne une diminution de la concentration du donneur à l'état triplet $[D_{T_1}]$ qui s'écrit :

$$\frac{d[D_{T_1}]}{dt} = -k_3 [D_{T_1}] [A_{S_0}]$$

Sous excitation continue, la concentration stationnaire du donneur à l'état triplet $[D_{T_1}]$ est alors donnée par la relation :

$$(\alpha_D)\ I = (k_{1_D} + k_{2_D} + k_3 [A_{S_0}])\ [D_{T_1}]$$

où (α_D) = rendement de la transition $S_1 \rightarrow T_1$ du donneur,

I = intensité de lumière incidente absorbée,

k_{1_D} et k_{2_D} = constantes de vitesse des désactivations radiative et non radiative, respectivement, de l'état triplet T_1 du donneur.

(α_D), I, k_{1_D} et k_{2_D} ne sont pas modifiés par la présence de l'accepteur. En l'absence de transfert on aurait :

$$(\alpha_D)\ I = (k_{1_D} + k_{2_D})\ [D_{T_1}]$$

Donc le transfert entraîne une diminution de la concentration stationnaire en molécules D à l'état triplet, c'est-à-dire une diminution des intensités de phosphorescence et du signal R. P. E.

La concentration stationnaire, en molécules accepteur A à l'état triplet T_1, est donnée par la relation (sous excitation continue) :

$$(k_{1_A} + k_{2_A})\ [A_{T_1}] = k_3 [A_{S_0}] [D_{T_1}] + \alpha_A I$$

Le dernier terme $(\alpha_A I)$ est à supprimer si l'accepteur n'est pas excité en même temps que le donneur.

b) *Étude des déclins de phosphorescence.*

Lorsque cesse l'excitation à l'instant $t = 0$, la concentration $[A_{T_1}]$ décroît suivant l'équation

$$\frac{d[A_{T_1}]}{dt} = -(k_{1_A} + k_{2_A})\ [A_{T_1}] + k_3 [A_{S_0}]\ [D_{T_1}]$$

avec :

$$[D_{T_1}]_t = [D_{T_1}]_{(t=0)} \cdot e^{-(k_{1_D} + k_{2_D} + k_3 [A_{S_0}])t}$$

Source : MNHN, Paris

La résolution de cette équation différentielle donne l'expression suivante pour la variation en fonction du temps de la concentration en molécules A à l'état triplet :

$$[A_{T1}]_t = [A_{T1}]_{(t=o)} \cdot e^{-\alpha t}$$

$$+ \frac{k_3 [A_{S0}] [D_{T1}]_{(t=o)}}{\alpha - \beta} \cdot (e^{-\beta t} - e^{-\alpha t})$$

où l'on a posé : $\alpha = k_{1_A} + k_{2_A}$

$$\beta = k_{1_D} + k_{2_D} + k_3 [A_{S_0}]$$

Cependant, si la constante de vitesse du transfert est grande par rapport à $(k_{1_D} + k_{2_D})$, c'est-à-dire si le transfert est pratiquement total ou si le temps de vie de l'état triplet du donneur est court par rapport à celui de l'accepteur, le deuxième terme des deux équations précédentes devient négligeable ($[D_{T_1}]$ tend rapidement vers 0). Le déclin est alors exponentiel et le temps de vie de l'état triplet de l'accepteur est le même que lorsque cet accepteur est excité directement $\mathcal{T}_A = \frac{1}{k_{1_A} + k_{2_A}}$.

Pour le donneur D isolé, le temps de vie est égal à $\frac{1}{k_{1_D} + k_{2_D}}$. Le transfert entraîne une diminution de ce temps de vie qui devient $\mathcal{T}_D = \frac{1}{k_{1_D} + k_{2_D} + k_3 [A_{S_0}]}$. Cette diminution devrait être la même que celle de l'intensité de phosphorescence ou du signal R.P.E. En réalité, les expériences de phosphorescence sensibilisée ont montré que la diminution de $\mathcal{T}_D$ est environ dix fois plus faible que celle de l'intensité de phosphorescence (18). Dans ces expériences, les donneurs sont des cétones aromatiques (benzo- ou acétophénone) et les accepteurs : naphtalène et dérivés. La diminution de l'intensité de phosphorescence du donneur varie de façon exponentielle avec la concentration en accepteur, et le déclin de phosphorescence, lorsque l'on coupe la lumière incidente, n'est plus exponentiel. [Le terme « déclin » sera réservé à la variation de l'intensité de phosphorescence dans des conditions opératoires données (solvant, température, concentration, intensité de lumière incidente) lorsque cesse l'excitation]. Toutes ces propriétés indiquent clairement une diminution rapide de la force d'interaction entre la molécule donneur D à l'état triplet et la molécule accepteur A non excitée, responsables du transfert non radiatif. La probabilité de transfert décroît en fonction du temps après le début du déclin ce qui explique le déclin non exponentiel. Un phénomène analogue est observé dans les expériences de fluorescence sensibilisée (transfert type FÖRSTER) : le rendement de fluorescence du donneur décroît environ deux fois plus vite que le temps de vie de fluorescence, et le déclin de fluorescence n'est plus exponentiel.

c) *Mécanisme du transfert.*

En supposant que la molécule de donneur ne change pas de position pendant le temps de vie de l'état triplet, ce qui est toujours le cas en solutions

Source : MNHN, Paris

rigides à 77° K, et que les molécules ne forment ni complexes, ni agrégats, la probabilité p de ne trouver aucune molécule d'accepteur dans le volume v autour de la molécule D excitée est donnée par la relation :

$$p = \lim_{c \to \infty} (1 - v)^{Nc} = e^{-vNc}$$

où c est la concentration de l'accepteur en M/l, v le volume de la solution en litres, N est le nombre d'Avogadro. Le rendement de phospborescence q est proportionnel à p. La variation de ce rendement en fonction de la concentration c en accepteur est donc donnée par la relation :

$$\frac{q_0}{q} = e^{vNc}$$

soit :

$$q = q_0 \, e^{-vNc}$$

q_0 étant le rendement de phosphorescence en l'absence d'accepteur. Cette relation a été vérifiée expérimentalement. Elle est identique à celle calculée par F. Perrin (49) pour expliquer la diminution de la fluorescence des colorants par augmentation de la concentration. Il a été montré (15) que la probabilité de transfert, dans ce phénomène de fluorescence sensibilisée et d'extinction de la fluorescence par concentration, était en $\frac{1}{R^6}$ où R est la distance entre les molécules interagissantes.

D'après les études de rendement quantique en fonction de la concentration en accepteur, on a pu déterminer le rayon de la sphère d'action v du donneur (18). Ce rayon a toujours été trouvé compris entre 11 et 15 Å. La probabilité de transfert triplet-triplet dépend du recouvrement des spectres d'émission de phosphorescence $T_1 \rightarrow S_0$ du donneur et d'absorption singulet $S_0 \rightarrow$ triplet T_1 de l'accepteur. Ce spectre d'absorption $S_0 \rightarrow T_1$ n'est généralement pas observable (Chapitre I). Cependant, on peut considérer qu'il est symétrique du spectre de phosphorescence $T_1 \rightarrow S_0$ par rapport à la transition $0 - 0$. Mais la probabilité de transfert ne dépend pas de la force oscillatoire de ces transitions singulet-triplet. Par exemple, le naphtalène et ses dérivés halogénés ont des spectres de pbosphorescence pratiquement identiques, donc des spectres d'absorption $S_0 \rightarrow T_1$ très voisins, mais des vitesses de désactivation radiative très différentes (donc des probabilités de transitions $S_0 \rightarrow T_1$ très différentes). Le recouvrement du spectre de phosphorescence de la benzopbénone, utilisée comme donneur, et du spectre d'absorption $S_0 \rightarrow T_1$ de ces accepteurs est donc sensiblement le même. On observe que l'extinction de la phospborescence de la benzophénone est quantitativement la même quel que soit le dérivé halogéné du naphtalène utilisé comme accepteur, bien que la force oscillatoire de la transition $S_0 \rightarrow T_1$ varie de façon considérable d'un dérivé à l'autre (18).

d) *Interprétation quantique.*

La phospborescence sensibilisée est le résultat d'une interaction dite de résonance d'échange entre une molécule à l'état triplet et une molécule non excitée. Les nuages électroniques des deux molécules doivent se recouvrir.

Source : MNHN, Paris

L'élément matriciel correspondant à l'interaction d'échange s'écrit (19) :

$$<H> = \int \varphi'^{*}_{D}(r_1)\,\varphi^{*}_{A}(r_2)\,H\,\varphi'_{A}(r_1)\,\varphi_{D}(r_2)\,\chi'^{*}_{D}(\sigma_1)\,\chi^{*}_{A}(\sigma_2)\,\chi'_{A}(\sigma_1)\,\chi_{D}(\sigma_2)\,d\tau$$

$'$ indique un état excité,

$*$ indique une quantité conjuguée,

$\chi(\sigma)$ sont les fonctions de spins

Fonction d'onde totale d'un état $\Psi(r, \sigma) = \varphi(r)\cdot\chi(\sigma)$,

Pour que l'intégrale ne s'annule pas, il faut que $\chi'_D = \chi'_A$ et $\chi_D = \chi_A$, mais χ' peut être différent de χ. Ces conditions sont remplies dans le cas d'un transfert triplet-triplet. Le transfert singulet-singulet peut se faire par un mécanisme identique mais, dans ce cas, le transfert par interaction dipôle-dipôle (FÖRSTER) se fait bien avant que les molécules s'approchent suffisamment l'une de l'autre pour que les nuages électroniques se recouvrent.

La probabilité de transfert par ce mécanisme de résonance d'échange s'écrit :

$$k_{D\to A} = \frac{2\pi}{\hbar} Z^2 \int_0^{\infty} F_D(\nu)\,\varepsilon_A(\nu)\,d\nu$$

$\varepsilon_A(\nu)$ absorption de l'accepteur ($S_0 \to T_1$),

$F_D(\nu)$ émission du donneur ($T_1 \to S_0$),

Z^2 varie comme $ye^{-2\frac{R}{L}}$ où y est une quantité sans dimension (< 1);

R distance entre A et D;

L rayon moyen de Bohr de D excité et A non excité.

L'exponentielle vient de ce que la densité électronique décroît de façon exponentielle avec la distance.

2° Étude de la phosphorescence des di- et trinucléotides : mise en évidence de transfert triplet-triplet de l'énergie d'excitation optique.

a) *Extinction de la phosphorescence des bases puriques dans les dinucléotides contenant une base purique et une base pyrimidique.*

Les dinucléotides de ce type étudiés sont :

A3'p5'C

G3'p5'C

A3'p5'U

L'étude a été faite dans le solvant eau + éthanol 1 : 4 v/v ou dans l'eau. Aux concentrations utilisées (de l'ordre de 10^{-4}M), seul le nucléoside purique (A ou G) donne une phosphorescence mesurable avec l'Aminco.

Source : MNHN, Paris

Il n'est jamais possible d'exciter l'une des bases sans exciter l'autre. Cependant on peut comparer le dinucléotide au mélange équimoléculaire des deux nucléosides correspondants à la même concentration. Les mélanges équimoléculaires des deux nucléosides

$$A + C$$

$$G + C \ (10^{-4}M \text{ chacun})$$

$$A + U$$

donnent une phosphorescence caractéristique du nucléoside purique c'est-à-dire qu'il n'y a pas, à ces concentrations, d'interactions dans le mélange.

Si l'on compare chaque dinucléotide avec le mélange équimoléculaire correspondant, on observe une diminution de l'intensité de phosphorescence du nucléoside purique. Cette diminution relative suit l'ordre décroissant suivant :

$$GpC > ApU > ApC$$

Simultanément on observe une décroissance du temps de vie de l'état triplet du nucléoside purique.

C'est ainsi que pour GpC en solution aqueuse, le temps de vie mesuré est environ 0,7 s (comparé à 1,2 s pour le temps de vie de la guanosine). Le déclin n'est pas parfaitement exponentiel, mais la faible intensité de phosphorescence de GpC ne permet pas de conclusion précise. Dans le cas du dinucléotide ApC, l'intensité de phosphorescence est suffisante pour faire des mesures de déclin à plusieurs longueurs d'onde. A des longueurs d'onde inférieures à 390 mμ, le déclin est bien exponentiel. Mais pour des longueurs d'onde supérieures à environ 390 mμ, le déclin n'est plus exponentiel et se présente comme la superposition de deux exponentielles de temps de vie respectifs 2,3 s et 0,9 s (fig. IV-2*b*). Dans le cas de l'adénosine seule, à la même concentration, le déclin est parfaitement exponentiel à toute longueur d'onde (fig. IV-2*a*).

Dans les généralités (IV-A-1) nous avons vu que le déclin de phosphorescence du donneur n'était plus exponentiel en présence de l'accepteur. Cependant, dans le dinucléotide ApC, le transfert se faisant avec une faible probabilité et l'allure de la courbe de déclin variant avec la longueur d'onde, on peut considérer que le déclin non exponentiel est dû plutôt à la superposition des déclins exponentiels de deux phosphorescences de temps de vie différents : l'une due au noyau A, l'autre due à C.

L'équation du déclin s'écrit donc :

$$I = I_{0,1}\, e^{-\frac{t}{\tau_1}} + I_{0,2}\, e^{-\frac{t}{\tau_2}}$$

Pour $t = 0$, $I_0 = I_{0,1} + I_{0,2}$. Les indices 1 et 2 se rapportent à l'adénosine et à la cytidine respectivement. La représentation des déclins en coordonnées semi-logarithmiques permet de calculer, aux différentes longueurs d'onde, l'intensité de phosphorescence $I_{0,2}$ sous excitation continue due à C :

$$I_{0,2} = I_0 - I_{0,1}.$$

Source : MNHN, Paris

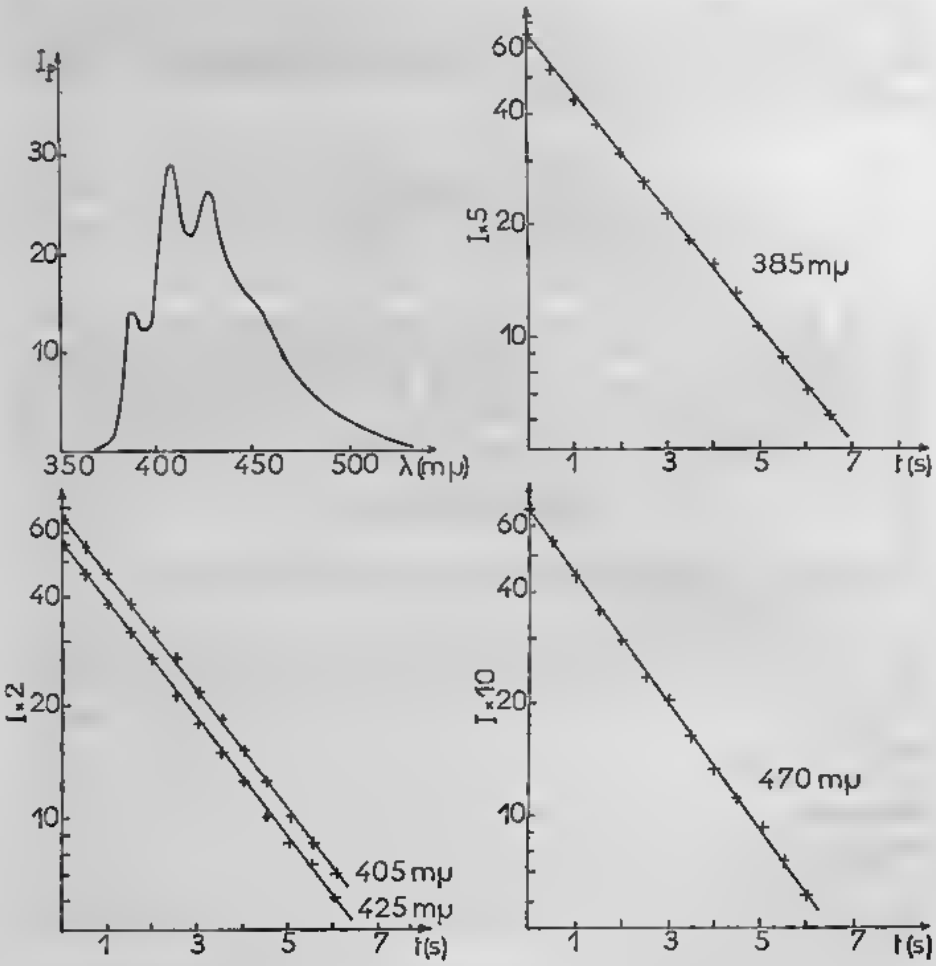


FIG. IV-2 *a*. — Spectres et déclins de phosphorescence de l'adénosine.

$I_{0,1}$ s'obtient par extrapolation de la droite correspondant au déclin de A

$$\left(I_1 = I_{0,1}\, e^{-\frac{t}{\tau_1}}\right).$$

On peut ainsi tracer le spectre de phosphorescence dû à C (fig. IV-2-*b*). Il coïncide en position avec celui que l'on obtient par excitation de solutions concentrées de cytidine (fig. III-10). Pour que l'on observe une phosphorescence due à la cytidine à cette faible concentration (10^{-4} M), il faut que le transfert de l'énergie d'excitation optique se fasse du niveau triplet le plus bas de l'adénosine au niveau triplet le plus bas de la cytidine, sans passer par le premier état singulet excité de cette dernière. Lorsque ce premier état singulet excité est atteint par excitation directe de la cytidine en solution, l'énergie y est dissipée et peu de molécules passent probablement par l'état triplet; ce qui explique le très faible taux de phosphorescence des solutions de cytidine. On peut donc conclure que l'excitation de la

Source : MNHN, Paris

phosphorescence de la base pyrimidique dans les dinucléotides contenant une base purique et une base pyrimidique est due à un transfert de l'énergie d'excitation de la base purique vers la base pyrimidique, par l'intermédiaire de leurs niveaux triplets (50).

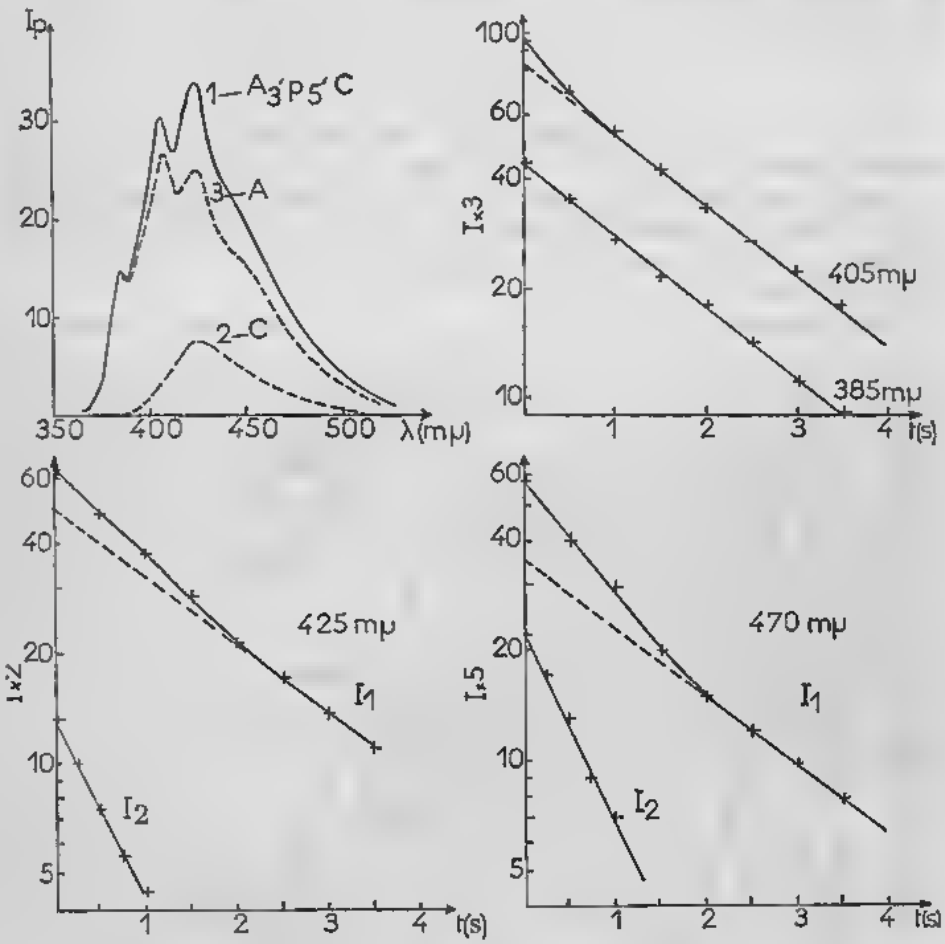


FIG. IV-2 *b*. — Spectres et déclins de phosphorescence de $A_3'p_5'C$.

b) *Transfert d'énergie triplet-triplet dans les dinucléotides contenant les deux bases puriques.*

Le type de ces dinucléotides est $G_2'p_5'A$.

Les maximums d'excitation des phosphorescences de G et A sont respectivement 290 et 280 mμ. Les spectres d'excitation se recouvrent et il est pratiquement impossible d'exciter G sans exciter A. Le maximum d'excitation de la phosphorescence du dinucléotide $G_2'p_5'A$ dans le solvant eau-propylène glycol (1 : 1 v/v) est 290 mμ ,c'est-à-dire identique à celui de G. Par contre, la phosphorescence enregistrée présente les caractéristiques de celle de A (position des pics, spectre résolu, temps de vie 2,6 s au lieu de 1,35 s pour G). De plus si la longueur d'onde d'excitation est fixée à 270 mμ,

Source : MNHN, Paris

longueur d'onde à laquelle les coefficients d'extinction de G et A sont égaux, on obtient une phosphorescence environ 3,5 fois plus intense que celle obtenue avec une solution d'adénosine seule de même concentration (fig. IV-3). Par excitation à 270 mμ, G et A absorbent le même nombre de photons. Les caractéristiques de désactivation de l'état triplet de A n'étant pas modifiées ($\tau = 2{,}6$ s), un transfert de l'énergie d'excitation de G vers A, par l'intermédiaire des états singulets, aurait multiplié l'intensité de phosphorescence de A par un facteur 2 seulement. Le facteur 3,5 obtenu expérimentalement ne peut donc s'expliquer que par un transfert entre états triplets de G vers A. D'autre part, le déclin de phosphorescence étant parfaitement exponentiel (temps de vie 2,6 s, fig. IV-3) le transfert de G vers A est pratiquement total (52). L'intensité de phosphorescence de A dans G_2p_5A étant 3,5 fois plus grande que celle de A excitée seule dans les mêmes conditions, cela implique que l'état triplet de G soit environ 2,5 fois plus peuplé que celui de A.

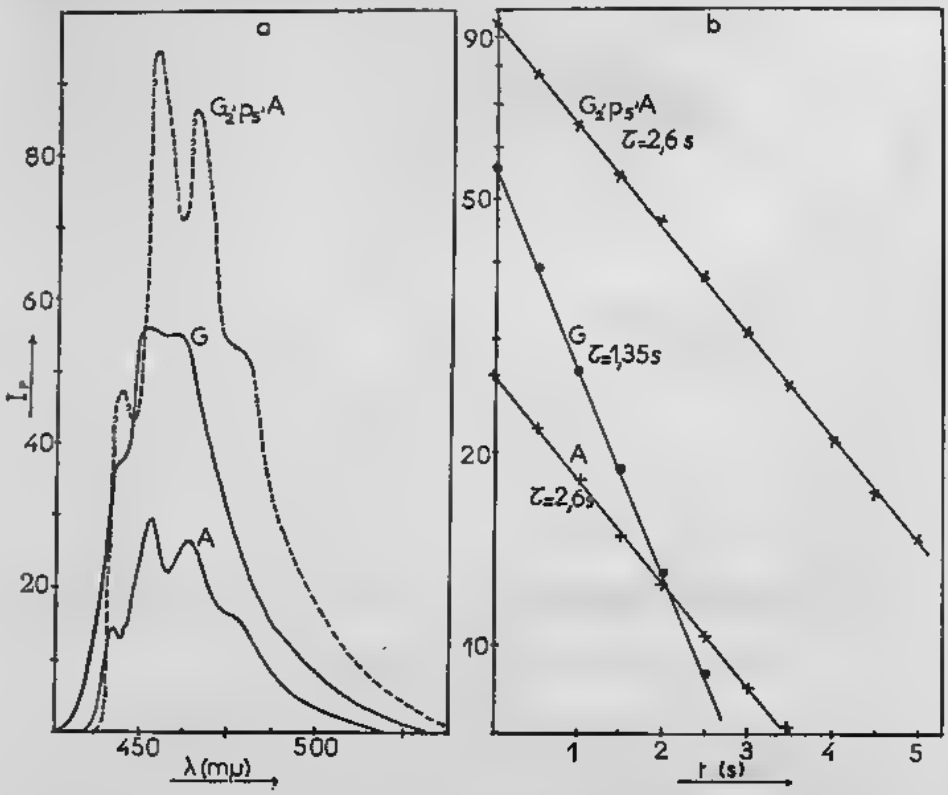


FIG. IV-3. — Spectres (*a*) et déclins (*b*) des phosphorescences de G, A et G_2p_5A. Excitation à 270 mμ. Solvant : eau + propylène glycol 1 : 1 v/v.

TERENIN et ERMOLAEV ont défini un rendement de phosphorescence sensibilisée qui, dans le cas du transfert de la molécule de guanosine G (donneur) à la molécule d'adénosine A (accepteur), s'écrit (17, 18) : $\gamma = \frac{Qp.s.a.}{Qog - Qg}$. $Qp.s.a.$ représente le nombre de photons émis à la suite du transfert triplet-triplet par l'adénosine, $Qog - Qg$ la différence entre le

Source : MNHN, Paris

nombre de photons émis par la guanosine G en l'absence ($Q_0 g$) et en présence (Qg) de l'accepteur, dans les mêmes conditions d'excitation. Dans le cas de $G_2{\cdot}p_5{\cdot}A$, on obtient ainsi $\gamma = \frac{2,5}{2} = 1,25$. γ peut être calculée à partir des rendements de fluorescence (Q_F) et de phosphorescence (Q_P) du donneur G et de l'accepteur A, en supposant que toute désactivation radiative se fait uniquement à partir de l'état triplet

$$\gamma = \frac{Q_{P,A}}{1 - Q_{P,A}} \times \frac{1 - Q^{\circ}_{F,G}}{Q_{P,G}}$$

Or expérimentalement à 77° K, on trouve $\frac{Q_{F,A}}{Q_{P,A}} \simeq 1$; $\frac{Q_{F,G}}{Q_{P,G}} \simeq 0,9$

$$Q_{P,G} \simeq 0,02 \quad \text{et} \quad Q_{P,A} \simeq 0,01$$

Le calcul de γ donne alors la valeur $\gamma = 0,5$.

La valeur précédemment obtenue expérimentalement : $\gamma = 1,25$ montre donc que, dans le cas de la guanosine et de l'adénosine, la désactivation non radiative ne se fait pas uniquement à partir de l'état triplet, mais certainement et préférentiellement à partir du niveau singulet. Si l'on désigne par α le rendement de la réaction de conversion $S_1 \rightarrow T_1$, pour une intensité d'excitation I, les concentrations en molécules à l'état triplet sont données par les relations :

$$[G_T] = \alpha_G \cdot I \cdot \tau_G \qquad \left(\tau = \frac{1}{k_1 + k_2}\right)$$

$$[A_T] = \alpha_A \cdot I \cdot \tau_A$$

$$\frac{[G_T]}{[A_T]} = \frac{\alpha_G}{\alpha_A} \times \frac{\tau_G}{\tau_A}$$

D'où l'on peut calculer $\frac{\alpha_G}{\alpha_A} = 5$. La probabilité de passage par l'état triplet est donc cinq fois plus grande pour la guanosine G que pour l'adénosine A.

c) *Influence de l'isomérie de la liaison phosphodiester sur le transfert.*

Cette influence a été étudiée :

1) sur une série de dinucléotides contenant adénosine et cytidine :

$A_3{\cdot}p_5{\cdot}C$

$C_3{\cdot}p_5{\cdot}A$

$A_5{\cdot}p\ p_5{\cdot}C$

2) sur deux dinucléotides contenant les deux bases puriques :

$G_2{\cdot}p_5{\cdot}A$

$G_3{\cdot}p_5{\cdot}A$

Source : MNHN, Paris

L'étude de l'influence de la liaison phosphodiester a été faite en comparant, pour une concentration donnée 10^{-4}M, l'intensité de phosphorescence et le temps de vie du donneur (adénosine) de la série de dérivés contenant adénosine et cytidine A_3p_5C, C_3p_5A, A_5pp_5C. Le taux de transfert peut se mesurer, soit par la diminution de l'intensité totale de phosphorescence, soit par celle du temps de vie de l'adénosine (voir paragraphe IV-A-2-*a*). Les résultats portés dans le tableau IV-1 montrent que l'ordre des taux de transfert croissants est :

$$A_3p_5C, \quad C_3p_5A, \quad A_5pp_5C$$

TABLE IV-1

CARACTÉRISTIQUES DE PHOSPHORESCENCE DES DINUCLÉOTIDES CONTENANT ADÉNINE ET CYTOSINE

	A	ApC	CpA	AppC
Intensité de phosphorescence. . .	240	217	180	112
Temps de vie de phosphorescence de l'adénosine (*s*)	2,6	2,3	2	1,8

De ces résultats, il faut retenir :

1) que l'ordre de succession des deux bases a une importance, c'est-à-dire que le recouvrement des orbitales π des deux bases n'est pas le même suivant que la liaison phosphate est 3′ — 5′ ou 5′ — 3′ (voir A_3p_5C et C_3p_5A).

2) que la liaison pyrophosphate permet un recouvrement plus important des orbitales π que la liaison phosphate simple. Cette propriété peut être expliquée par une plus grande flexibilité de la liaison entre les deux nucléosides. Elle est confirmée par les études d'hypochromisme qui montrent que les interactions sont plus grandes dans un dinucléoside pyrophosphate que dans le dinucléotide correspondant.

Par contre les résultats obtenus sur les deux dinucléotides G_2p_5A et G_3p_5A sont pratiquement identiques. On trouve un transfert de la guanosine vers l'adénosine pratiquement total. Ce transfert se fait par l'intermédiaire des niveaux triplets comme le montre l'étude des rendements quantiques de phosphorescence [voir paragraphe *b* précédent]. Ainsi, que la liaison phosphate se fasse en 2′5′ ou en 3′5′, peu de modifications sont apportées aux interactions d'échange électronique.

d) *Influence du pH sur le transfert d'énergie dans les dinucléotides.*

La variation du pH de la solution d'un dinucléotide permet l'ionisation (positive ou négative) de l'une des bases ou des deux bases simultanément.

Par étude de l'hypochromie et de la dispersion optique rotatoire, TINOCO et ses collaborateurs (51) ont pu déterminer les dinucléosides

Source : MNHN, Paris

phosphate qui possédaient une structure secondaire à 3 pH différents (1; 7; 11,5). En milieu acide ou alcalin, l'étude par phosphorescence du transfert entre les deux bases n'est évidemment possible que si l'une au moins des deux bases est phosphorescente dans ces conditions.

Ainsi en se plaçant à pH 1, les deux bases des dinucléosides phosphate G_3p_5C, A_3p_5C ou G_3p_5A fixent chacune un proton. Nous désignerons ces nouveaux composés par les symboles $G_3^+p_5C^+$, $A_3^+p_5C^+$ ou $G_3^+p_5A^+$. A pH 11,5, on obtient par exemple les dinucléotides $G_3^-p_5C$, $G_3^-p_5A$, $A_3p_5U^-p$ où le signe — indique que la base correspondante a perdu un proton.

L'existence d'un transfert d'énergie triplet-triplet dans ces conditions de pH peut être démontrée par les mêmes moyens qu'en milieu neutre. De plus, par chauffage modéré en milieu acide ou alcalin, on peut provoquer une hydrolyse plus ou moins complète du dinucléotide. On possède donc un moyen de comparer directement le dinucléoside phosphate au mélange équimoléculaire correspondant. L'hydrolyse se fait en 5′; par exemple le dinucléoside phosphate G_3p_5C donnera un mélange $G_3p + C$ (ou $G_2p + C$, l'hydrolyse se faisant par l'intermédiaire d'un nucléotide cyclique).

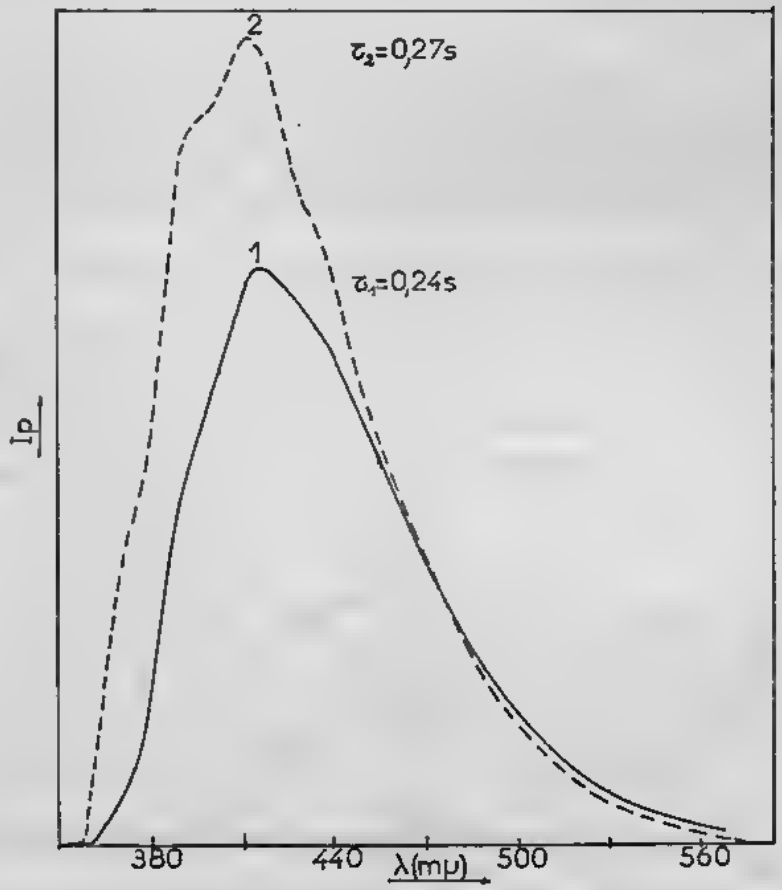


FIG. IV-4. — Phosphorescence de G^+pC^+ avant (1 ——) et après (2 ——) hydrolyse.

Source : MNHN, Paris

Le résultat essentiel de cette étude est que, même lorsque les deux bases ont acquis une charge positive, la répulsion n'entraîne pas la disparition automatique de la structure secondaire du dinucléoside phosphate. Ainsi le dinucléoside phosphate $G_3^5 p_5 C^+$ donne à 77° K une phosphorescence caractéristique de C^+. Après une heure de chauffage de la solution à 60° C en tube scellé, l'intensité de phosphorescence est multipliée par un facteur 3 environ et le spectre de phosphorescence, déplacé vers les courtes longueurs d'onde, présente alors les caractéristiques de celui de G^+ (fig. IV-4). Il y a donc eu transfert dans $G_3^5 p_5 C^+$ de G^+ vers C^+. L'hypochromisme calculé par Tinoco et collaborateurs (51) est d'ailleurs le même (7 %) dans G^+pC^+ que dans GpC à pH 7 ce qui confirme l'existence du recouvrement des nuages électroniques des deux bases. De même l'existence d'interactions dans les composés A^+pC^+, C^+pA^+, A^+ppC^+ est démontrée par l'augmentation de l'intensité de phosphorescence de ces composés après hydrolyse, intensité qui se trouve multipliée par les facteurs 2, 4 et 5 respectivement.

e) *Influence de la substitution de la base pyrimidique sur le transfert d'énergie dans les dinucléosides pyrophosphate contenant adénosine et cytidine ou adénosine et uridine.*

Les dérivés pyrimidiques substitués utilisés ont été la 5-bromocytidine (5 BrC), la 5-bromo-uridine (5 BrU) et la N_4-acétyl-cytidine (AcC). La substitution d'un brome en position 5 provoque un déplacement bathochrome du spectre d'absorption de la cytidine (273 mμ →297 mμ) et l'apparition d'une phosphorescence caractéristique ($\lambda_{max.} = 450$ mμ, $\tau < 8 \cdot 10^{-2}$ s) (voir chap. III). Le spectre d'absorption du dinucléoside pyrophos-

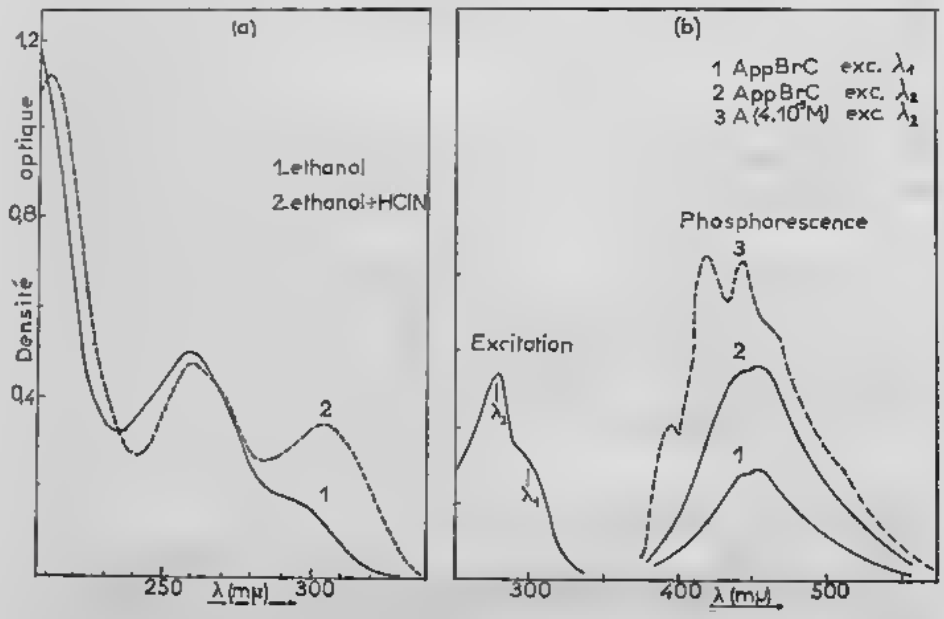


Fig. IV-5. — Spectres d'absorption (*a*), d'excitation et de phosphorescence (*b*) de AppBrC dans l'éthanol $c = 4 \cdot 10^{-5}$ M.

Source : MNHN, Paris

phate A_5-pp_5-BrC est caractérisé par la présence de deux bandes, ayant leurs maximums vers 295 et 260 mμ, dues respectivement à BrC et A (fig. IV-5). A 260 mμ, longueur d'onde du maximum correspondant à A, l'absorption due à BrC est environ $\frac{1}{10}$ de l'absorption totale. Le spectre d'excitation de la phosphorescence d'une solution $0{,}3 \cdot 10^{-4}$M de AppBrC dans l'éthanol à 77° K se compose également de deux bandes. L'excitation à $\lambda_1 = 300$ mμ (absorption due à BrC) ou à $\lambda_2 = 270$ mμ (absorption due en grande partie à A) donne le même spectre de phosphorescence caractéristique de l'état triplet de BrC alors qu'une solution d'adénosine de même concentration, excitée à $\lambda_2 = 270$ mμ donne le spectre de phosphorescence caractéristique de A (fig. IV-5) nettement distinct de celui obtenu avec AppBrC. Donc dans AppBrC, le transfert de l'énergie d'excitation de A vers BrC est pratiquement total, puisque l'on ne peut déceler, dans le spectre de phosphorescence du dinucléoside pyrophosphate, aucune émission due à A.

Dans le dinucléoside pyrophosphate A_3-pp_5-BrU, la phosphorescence de l'adénosine est pratiquement totalement éteinte, ce qui peut s'expliquer par un transfert de l'énergie de A vers BrU sans que l'on puisse préciser si ce transfert se fait par l'intermédiaire des états singulets ou des états triplets (comme dans le cas de AppBrC).

La substitution du groupement amino ($-NH_2$) de la cytidine par un

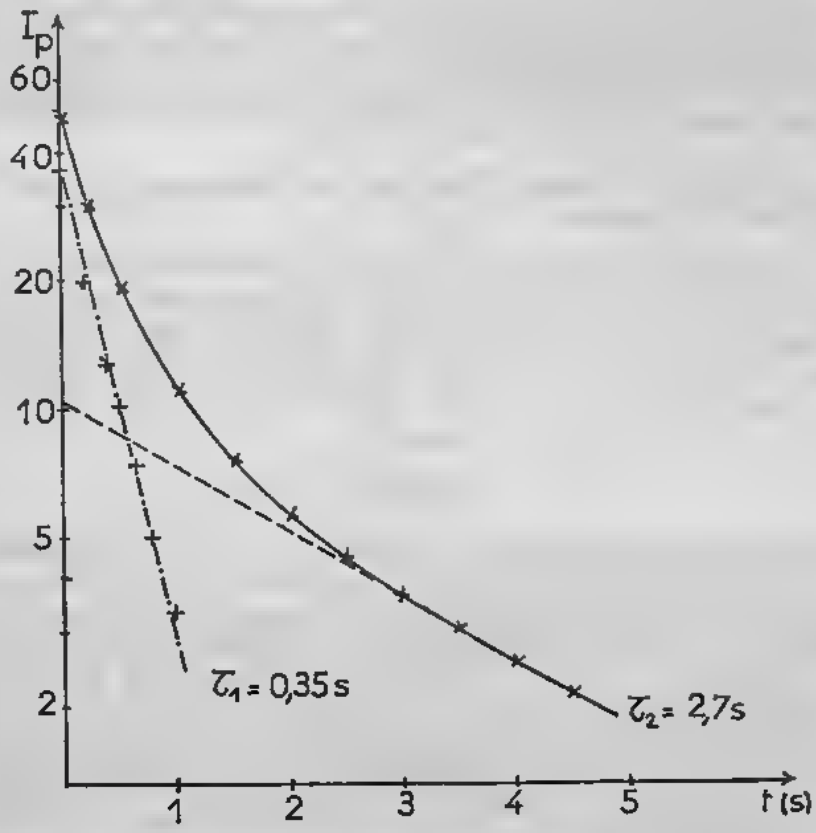


FIG. IV-6. — Déclin de phosphorescence de AppAcC (excitation : 310 mμ).

Source : MNHN, Paris

groupement acétylamino (CH_3—C(=O)—NH—) entraîne un déplacement batho-

chrome du spectre d'absorption (273 mμ → 299 mμ) et un déplacement hypsochrome du spectre de phosphorescence tel que le niveau triplet le plus bas de la N_4-acétylcytidine a une énergie plus grande que celle du niveau correspondant de l'adénosine (voir chapitre III). Le dinucléoside pyrophosphate AppAcC représente donc un cas privilégié dans lequel on peut exciter de façon sélective le composé ayant le niveau triplet le plus haut (AcC) (voir figure IV-1). L'excitation d'une solution 10^{-4}M de ce dinucléoside pyrophosphate dans le mélange eau-propylène glycol 1 — 1 v/v á 315 mμ (longueur d'onde à laquelle seul AcC absorbe) donne une phosphorescence dont le spectre est la superposition des deux phospborescences de A et AcC. Le déclin est la superposition de deux exponentielles, les temps de vie correspondant étant respectivement 0,35 s (AcC) et 2,7 s (A) (fig. IV-6). A la même concentration (10^{-4}M), le mélange équimoléculaire AcC + A excité à 315 mμ ne donne naissance qu'à la phosphorescence caractéristique de AcC dont le déclin est parfaitement exponentiel. Pour observer le transfert de l'énergie d'excitation de AcC vers A dans le milieu eau-propylène glycol 1 — 1 (v/v) pour le mélange équimoléculaire, il faut que la concentration de chacun des partenaires dépasse 5.10^{-3}M.

Puisque à 315 mμ l'absorption due à l'adénosine est nulle et que l'on peut néanmoins observer la phosphorescence de l'adénosine dans le dinucléoside pyrophosphate AppAcC excité à cette longueur d'onde, on peut conclure qu'une partie de l'énergie d'excitation de l'acétylcytidine a été transférée vers l'adénosine et que ce transfert n'a pu se faire que par l'intermédiaire des états triplets des deux nucléosides.

f) *Extension des résultats obtenus sur les dinucléosides phosphate aux trinucléosides diphosphate.*

Les résultats concernant les dinucléosides phosphate présentés dans ce chapitre peuvent-ils être étendus à des oligonucléotides de chaîne plus longue ? Les trinucléosides diphosphate synthétisés par voie chimique sont difficiles á obtenir. Notre étude s'est donc bornée à deux de ces trinucléosides contenant trois nucléosides différents G, A, U, mais dont l'ordre de succession varie :

GpApU

GpUpA

Les liaisons phosphodiester sont des liaisons 3′ — 5′ et 2′ — 5′ (mélange). On sait que l'énergie d'excitation peut être transférée de G vers A, de A vers U et a fortiori de G vers U. On doit donc s'attendre, dans les deux trinucléosides, à une extinction de la phospborescence des nucléosides puriques. C'est ce que montrent les études de phosphorescence de ces deux composés en solution aqueuse congelée à 77° K. Dans GpUpA, le spectre de phosphorescence ressemble à celui d'un mélange de G et A, le transfert ne se faisant que partiellement de G et A vers U. Par contre, le spectre de phospborescence de GpApU a une structure analogue à celle de A, ce qui correspond au transfert total de G vers A et à un transfert partiel seulement de A vers U.

Cette étude est évidemment limitée par le petit nombre de composés

Source : MNHN, Paris

qui peuvent être synthétisés par voie chimique. Rappelons que l'utilisation d'oligonucléotides obtenus par hydrolyse enzymatique de hauts polymères est rendue extrêmement difficile du fait du grand rendement de phosphorescence des enzymes utilisés qui, même à un très faible pourcentage, masquent les phénomènes dus aux oligonucléotides.

3° Étude du transfert d'énergie par résonance paramagnétique électronique.

Comme nous l'avons montré au chapitre II, l'avantage essentiel de l'utilisation de la résonance paramagnétique électronique pour l'étude des transferts réside dans le fait que les signaux de résonance des états triplets des deux partenaires (donneur et accepteur) sont en général beaucoup mieux séparés (position en champ) que ne le sont les spectres de phosphorescence. Par contre, la sensibilité plus faible de la R. P. E. (10^{11} spins) limite son emploi à des cas privilégiés. Ainsi les valeurs de $H_{min.}$ pour la guanosine et l'adénosine sont respectivement de 1380 et 1430 gauss à la fréquence de 9216 Mc/s. Lorsque le dinucléotide G_2p_5A en solution dans le mélange eau-propylène glycol 1 — 1 v/v, à la concentration de 7.10^{-4}M, est optiquement excité dans la cavité à 77° K, on n'observe qu'un signal de résonance à 1430 gauss, 4 à 5 fois plus intense que celui de l'adénosine (fig. IV-7) à la même concentration. Aucun signal de la guanosine ne peut être détecté. Ces expériences confirment donc que l'énergie d'excitation de la guanosine a été transférée vers l'adénosine sans cependant permettre de conclure que ce transfert se fait par l'intermédiaire des états triplets, le donneur et l'accepteur étant excités simultanément.

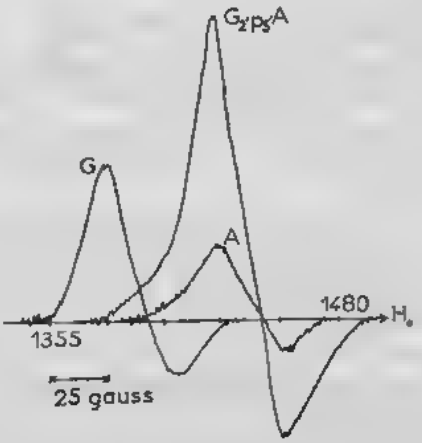


Fig. IV-7. — Spectres R. P. E. des états triplets de G, A et $G_2{\cdot}p_5{\cdot}A$.

Pour l'acétylcytidine, la valeur de $H_{min.}$ est 1373 gauss. Le dinucléotide pyrophosphate AppAcC ne donne qu'un signal de résonance, celui de l'adénosine, même lorsque l'excitation est faite avec une lame de verre interposée entre la source et l'échantillon. Dans ces conditions, l'adénosine seule n'est pas excitée et ne donne évidemment aucun signal de résonance. Ainsi

Source : MNHN, Paris

l'énergie d'excitation sélective de l'acétylcytidine est transférée sur l'adénosine et le seul mode de transfert possible est un transfert triplet-triplet. Ces résultats sont confirmés par des expériences sur des mélanges équimoléculaires d'acétylcytidine et d'adénosine, analogues à celles réalisées pour la première fois par TERENIN et ERMOLAEV (17). Lorsque la concentration de ces mélanges est supérieure à 5.10^{-3}M, par excitation par des radiations de longueurs d'onde supérieures à 300 mμ, sélectivement absorbées par l'acétylcytidine, on enregistre non seulement le signal de résonance de l'acétylcytidine, mais aussi celui de l'adénosine. Ceci prouve que le transfert a lieu dans le même sens que dans le dinucléoside ApAcC. La répartition statistique des molécules rend la probabilité de transfert beaucoup plus faible.

4° Transfert d'énergie entre dérivés des acides nucléiques en solutions aqueuses congelées à 77° K.

Lorsque des solutions aqueuses de nucléosides sont congelées à 77° K, les études de phosphorescence montrent que les molécules du soluté sont exclues du réseau cristallin de la glace et forment des agrégats (chapitre III, paragraphe C-2-*b*). La formation des agrégats se traduit par une extinction de la phosphorescence. Lorsque l'on ajoute 1 % d'éthanol à une solution aqueuse de purine, l'intensité de pbosphorescence à 77° K est multipliée par un facteur 20, tandis que le temps de vie reste pratiquement inchangé. Simultanément les spectres d'excitation et de phosphorescence se déplacent vers les courtes longueurs d'onde tandis qu'apparaît une structure vibrationnelle dans le spectre de phosphorescence. L'ensemble de ces observations conduit à admettre :

1) que des agrégats se sont formés dans la glace.

2) que ces agrégats sont détruits par la présence de faibles quantités d'éthanol avec formation de liaisons hydrogène soluté-éthanol.

Les résultats expérimentaux et les conclusions précédentes sont analogues pour les nucléosides.

Si on congèle un mélange de deux nucléosides en solution aqueuse, deux phénomènes peuvent se produire :

1) formation d'agrégats mixtes dans lesquels l'alternance des molécules est quelconque.

2) formation de complexes par liaisons hydrogène entre les molécules de deux nucléosides différents.

La première hypothèse est la plus plausible mais, lorsque les deux nucléosides correspondent aux bases appariées (A + T ou G + C) des acides nucléiques, la seconde n'est pas à rejeter a priori. Les résultats de phosphorescence obtenus sur ces mélanges permettent de montrer que, même dans ce cas, la formation d'agrégats mixtes est toujours prépondérante. Dans certains cas cependant (AcC + G, BrC + G), l'étude de l'émission conduit à admettre la formation de complexes par liaisons hydrogène (paragraphe C).

Source : MNHN, Paris

a) *Étude des mélanges adénosine-thymidine (et dérivés).*

Lorsqu'à une solution aqueuse $5 \cdot 10^{-3}$M d'adénosine on ajoute des proportions croissantes de thymidine, la phospborescence de l'adénosine ($\lambda_{max.} = 435$ mμ, $\mathcal{T} = 2{,}3$ s) disparaît tandis qu'apparaît une phosphorescence dont les caractéristiques sont les suivantes pour un mélange équimoléculaire : $\lambda_{max.} = 470$ mμ, $\mathcal{T} = 0{,}23$ s (fig. IV-8-*a*). La phosphorescence de la thymidine ($\lambda_{max.} = 470$ mμ) en solution aqueuse congelée à 77° K est très faible même à des concentrations de l'ordre de 10^{-2}M. En milieu basique (ammoniaque 1 N) apparaît une phosphorescence : $\lambda_{max.} = 445$ mμ, $\mathcal{T} = 0{,}38$ s. Dans ce milieu, la thymidine est ionisée (pK = 9,8), le proton attaché à l'azote N_3 étant libéré. On pourrait donc penser que la phosphorescence enregistrée pour le mélange équimoléculaire A + T est due à la thymidine ionisée T^-. Cependant, si l'on remplace dans le mélange A + T, la thymidine

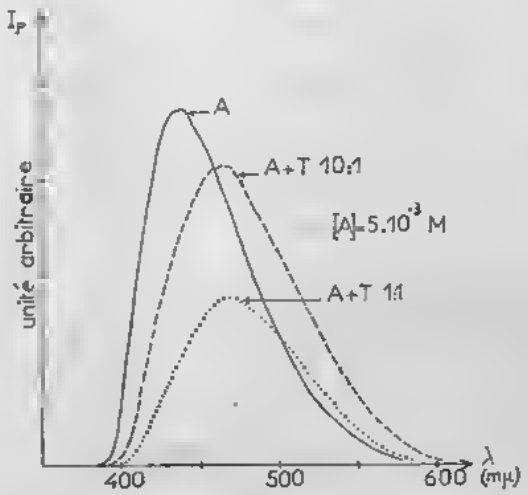


FIG. IV-8 *a*. — Spectres de phosphorescence de A et de mélanges A + T dans H_2O à 77° K.

par la 3-méthylthymidine (MT) ou la 1,3-diméthylthymine (DMT), qui ne peuvent s'ioniser, les mêmes modifications de la phosphorescence sont observées. Par exemple, la phosphorescence du mélange équimoléculaire A + DMT a les caractéristiques suivantes : $\lambda_{max.} = 470$ mμ; $\mathcal{T} = 0{,}3$ s (table IV-2). La diméthylthymine en milieu aqueux à 77° K ne phosphoresce pas plus que la thymidine, mais une phosphorescence peut être enregistrée en milieu basique (ammoniaque N) ou par addition de 10 % d'éthanol à la solution aqueuse. Dans ces deux cas, les caractéristiques sont les mêmes : $\lambda_{max.} = 455$ mμ, $\mathcal{T} = 0{,}5$ s. Ces observations prouvent que l'apparition d'une phosphorescence en milieu basique n'est pas due seulement à une ionisation, mais plutôt à un effet d'environnement. L'ionisation a pour conséquence une diminution de la probabilité de transition singulet-singulet (c'est-à-dire du coefficient d'extinction), mais sans déplacement du maximum d'absorption (donc pas de modification notable de la conjugaison). La probabilité de conversion singulet-triplet peut donc s'en trouver augmentée sans que la position du niveau triplet

Source : MNHN, Paris

ne soit sensiblement modifiée. Ces hypothèses sont confirmées par les études de R. P. E. (voir Chapitre III, paragraphe B-2). L'apparition de la phosphorescence de la thymidine, de la 3-méthylthymidine ou de la 1,3-diméthylthymine dans des mélanges équimoléculaires avec l'adénosine peut donc s'expliquer par un transfert d'énergie entre états triplets (53).

TABLE IV-2

CARACTÉRISTIQUES (TEMPS DE VIE τ ET λ MAX.) DE PHOSPHORESCENCE DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES ET DE MÉLANGES ÉQUIMOLÉCULAIRES EN SOLUTION AQUEUSE CONGELÉE A 77° K.

	τ (s)	λmax. (mμ)		τ (s)	λmax. (mμ)
Adénosine (A) (H_2O)	2,3	435	A + T (1 : 1) $5\cdot10^{-3}$M	0,21	470
Guanosine (G) (H_2O)	1,2	430	G + T (1 : 1) 10^{-3}M	0,22	470
Cytidine (C) (H_2O)	0,6	435	C + T (1 : 1) $5\cdot10^{-3}$M	0,22	470
1 - méthyl - N_4 - acétyl-cytosine (AcC) (H_2O)	0,32	425	AcC + T (1 : 1) $5\cdot10^{-4}$M	0,21	475
Uridine (U) (Ammoniaque N)	0,5	415	A + MT (1 : 1) $5\cdot10^{-3}$M	0,26	465
Thymidine (T) (Ammoniaque N)	0,4	445	AcC + MT (1 : 1) $5\cdot10^{-4}$M	0,24	465
3 - méthylthymidine (MT) (Ammoniaque N)	0,6	450	A + DMT (1 : 1) $5\cdot10^{-3}$M	0,3	470
1,3 - diméthylthymine (DMT) (Ammoniaque N ou eau + 10 % éthanol)	0,5	455	AcC + DMT (1 : 1) $5\cdot10^{-3}$M	0,3	465

b) *Étude des mélanges de 1-méthyl-N_4-acétylcytosine (AcC) et de thymine ou dérivés.*

Les résultats reportés ci-dessus pour les mélanges A + T sont pratiquement identiques si l'on remplace A par AcC (table IV-2). La phosphorescence de AcC ($\lambda_{max.} = 425$ mμ, $\tau = 0{,}32$ s) disparaît tandis qu'apparaît la phosphorescence de T ($\lambda_{max.} = 475$ mμ, $\tau = 0{,}21$ s pour un mélange équimoléculaire). De même les mélanges équimoléculaires AcC + MT et AcC + DMT conduisent à l'apparition de la phosphorescence de MT et DMT respectivement (table IV-2).

Source : MNHN, Paris

Le maximum d'excitation de la phosphorescence de AcC en solution aqueuse congelée est à 310 mμ. A cette longueur d'onde, l'absorption de T (ou MT, ou DMT) est nulle. Or les spectres d'excitation des mélanges AcC + T, AcC + MT, AcC + DMT sont identiques à ceux de AcC seule (fig. IV-8-*b*). En conséquence, le transfert d'énergie qui a eu lieu de AcC vers T (ou MT ou DMT) n'a pu se faire qu'entre les niveaux triplets des deux molécules. Ces résultats confirment donc l'hypothèse d'un transfert triplet-triplet dans le cas où le donneur est l'adénosine au lieu de AcC.

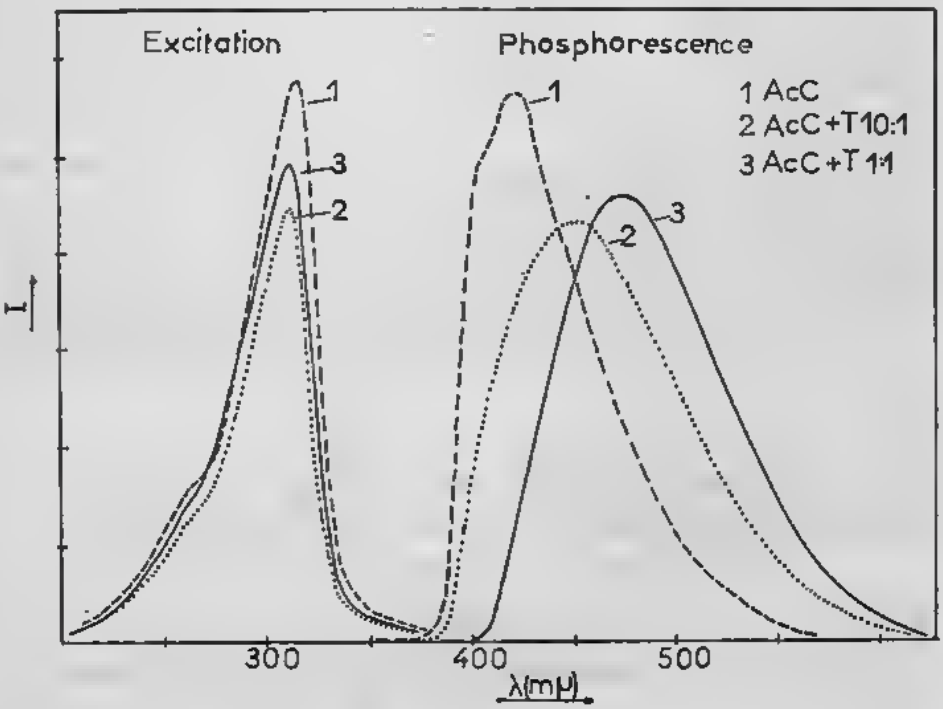


FIG. IV-8 *b*. — Spectres d'excitation et de phosphorescence de solutions aqueuses congelées à 77° K. Concentration de AcC = 5.10^{-4} M.

c) *Énergies relatives des états triplets des nucléosides en solutions aqueuses congelées.*

La non-intervention des liaisons hydrogène dans le transfert triplet-triplet, en solutions aqueuses congelées à 77° K, est confirmée par l'étude de mélanges de guanosine et de thymidine, nucléosides qui ne peuvent donner lieu à la formation de liaisons hydrogène entre eux. Le mélange équimoléculaire G + T se comporte comme le mélange équimoléculaire A + T. On n'observe que la phosphorescence de l'état triplet de T atteint par transfert à partir de l'état triplet de G.

L'uridine se comporte d'une manière analogue à la thymidine. La phosphorescence des mélanges équimoléculaires AcC + U et A + U est identique à celle de AcC et A respectivement. Seule une extinction de la phosphorescence est observée. Ces résultats montrent que l'état triplet de U peut être atteint par transfert triplet-triplet. Le 1-méthyluracile et le

Source : MNHN, Paris

1,3-diméthyluracile se comportent comme l'uridine. L'examen des spectres de phosphorescence (fig. IV-9) montre que l'état triplet de l'uridine, que l'on peut observer en milieu basique, comme celui de la thymidine, a une

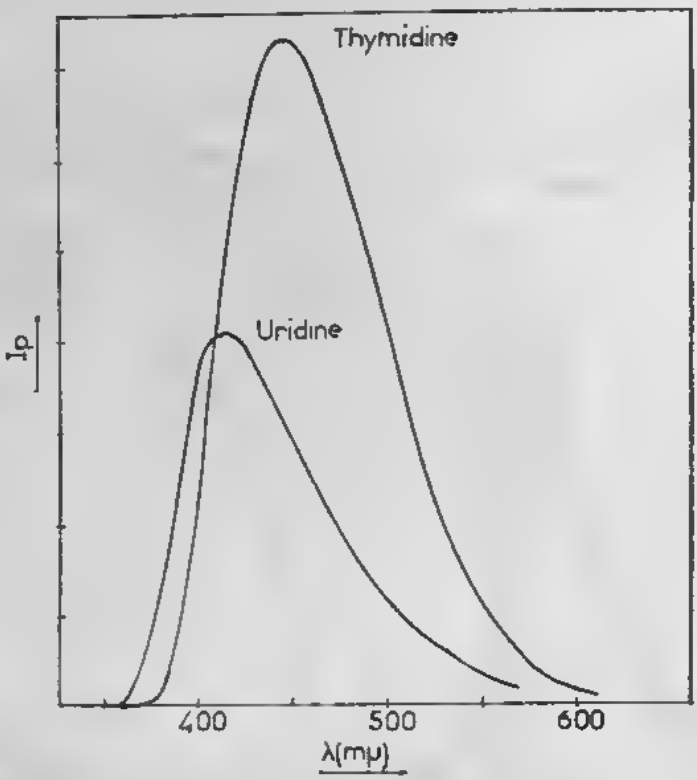


Fig. IV-9. — Spectres de phosphorescence dans $H_2O + NH_4OH$. $c = 5.10^{-3}$ M.

énergie supérieure à celle de l'état triplet de T. L'ordre d'énergie décroissante des états triplets des nucléosides en solution aqueuse congelée à 77° K peut donc être ainsi déterminé en étudiant le transfert (ou l'absence de transfert) entre deux de ces nucléosides. On trouve l'ordre suivant :

$$C > AcC > G \ , \ A > U > T > BrC$$

Lorsque la solution aqueuse contient quelques pour cent d'éthanol, nous avons vu que les agrégats étaient détruits et que les molécules du soluté formaient alors des liaisons hydrogène avec l'éthanol. Ces deux phénomènes ont, en particulier, comme conséquence de déplacer le spectre de phosphorescence vers les courtes longueurs d'onde, donc d'augmenter l'énergie de l'état triplet. Cette augmentation est particulièrement importante pour les nucléosides puriques. L'ordre, par énergies décroissantes, des états triplets devient alors le suivant (Chapitre III, paragraphe D).

$$AcC > G > A > C \ , \ U > T > BrC > BrU$$

Source . MNHN, Paris

En particulier on remarque que, dans cette série, l'état triplet de U est plus bas en énergie que celui des deux nucléosides puriques. Ceci explique en particulier que dans le poly A-U en double hélice, où les bases sont alternées et appariées, on observe la phosphorescence de U (42) alors que dans le mélange A + U en solution aqueuse congelée, on ne peut observer que difficilement le transfert triplet-triplet de A vers U.

Dans le complexe en double (ou triple) hélice poly A + poly U (ou poly A + 2 poly U), on observe l'extinction totale de la fluorescence et de la phosphorescence de A (41). Dans les mélanges A + U en solution aqueuse congelée, un phénomène analogue est observé. Par exemple, l'intensité de phosphorescence du mélange équimoléculaire A + U est environ 7 fois plus faible que celle d'une solution d'adénosine pure de même concentration. Cette extinction trouve probablement son origine dans un transfert d'énergie entre états singulets de l'adénosine vers l'uridine. Ces expériences montrent en outre que, pour observer la phosphorescence de U à la suite d'un transfert triplet-triplet de l'énergie d'excitation de A, il faut que les molécules A et U soient superposées comme dans le poly *r* A-U et non appariées comme dans le complexe poly A-poly U. Cette superposition des noyaux hétérocycliques de A et U permet en effet le recouvrement des orbitales π que nécessite le transfert triplet-triplet alors que ce recouvrement est évidemment très faible pour deux bases appariées.

B. — INTERACTIONS DE TYPE EXCITONIQUE ENTRE LES BASES SUPERPOSÉES D'UN HOMO-DINUCLÉOTIDE

Bien que des interactions de type excitonique aient été prévues et calculées théoriquement pour les polymères en hélice et même pour une double hélice du type ADN, aucune preuve expérimentale n'a été apportée si ce n'est, très récemment, par des résultats de dispersion optique rotatoire ou de dichroïsme circulaire (58, 59).

La mise en évidence de telles interactions est difficile à réaliser lorsque les différentes unités qui constituent le polymère ne sont pas identiques. Dans le cas des acides nucléiques, les quatre nucléosides ont des spectres d'absorption qui se recouvrent dans la région de 2 600 Å où ils ont tous une bande d'absorption. Il peut donc exister dans cette région des états excitoniques s'étendant à toute l'hélice. Mais les spectres de la guanosine et de la cytidine s'étendent beaucoup plus loin vers les grandes longueurs d'onde que ceux de l'adénosine et de la thymidine (ou de l'uridine), celui de la guanosine s'étendant le plus loin. Donc aux plus grandes longueurs d'onde (vers 300 mμ), la seule interaction excitonique possible est entre des résidus guanine, ce qui ne peut se produire que dans les régions où se succèdent des paires guanine-cytosine. En conséquence, les plus bas niveaux excités de l'ADN sont isolés de la bande excitonique principale et correspondent au plus à des niveaux excitoniques localisés. Pour essayer de démontrer l'existence d'interactions de type excitonique, il faut donc faire appel à des chaînes contenant des motifs identiques, la plus simple étant un homo-dinucléotide comme $A_3{\cdot}p_5{\cdot}A$ ou $A_5{\cdot}pp_5{\cdot}A$.

Source : MNHN, Paris

1° Étude théorique de l'interaction excitonique dans un dinucléotide.

a) *Largeur de bande de l'exciton.*

Considérons deux molécules planes, identiques, parallèles et situées à une distance r, représentées sur la figure IV-10-*a* par des rectangles. Ces deux molécules u et v représentent, par exemple, les deux noyaux puriques d'un dinucléotide comme ApA.

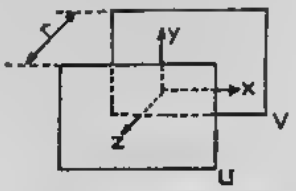


FIG. IV-10 *a*.

L'axe z est paralléle à la ligne des centres des deux molécules. Supposons d'abord que les axes des molécules soient parallèles aux axes du trièdre de référence. La fonction d'onde Ψ_G de l'état fondamental est représentée par $\Psi_G = \Psi_u \Psi_v$. Cet état est totalement symétrique pour toutes les opérations de symétrie du dimère.

Le premier état excité peut être décrit par deux fonctions :

$$\Psi_1 = \Psi_u^* \Psi_v \qquad \text{et} \qquad \Psi_2 = \Psi_u \Psi_v^*$$

(l'astérisque indique que la fonction d'onde correspond au premier état excité de la molécule).

Les fonctions d'onde stationnaires du système sont donc

$$\Psi_I = \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_u \Psi_v^* + \Psi_u^* \Psi_v) \text{ symétrique}$$

$$\Psi_{II} = \frac{1}{\sqrt{2}} (\Psi_u \Psi_v^* - \Psi_u^* \Psi_v) \text{ antisymétrique}$$

Dans chacun de ces états stationnaires, l'excitation est délocalisée sur l'ensemble des deux molécules. L'énergie W d'interaction est donnée par

$$W = \iint \Psi_u \Psi^*_v V_{uv} \Psi_u^* \Psi_v \, d\tau_u \, d\tau_v$$

Le potentiel de perturbation V_{uv} se réduit, pour des transitions dipolaires électriques permises, à l'interaction dipôle-dipôle

$$V_{uv} = -\frac{e^2}{r_{uv}^3} \sum_{i,j} (2z_u^i z_v^j - x_u^i x_v^j - y_u^i y_v^j)$$

Source : MNHN, Paris

r_{uv} est la distance entre les dipôles (supposés ponctuels) des molécules u et v; x_u^i est la coordonnée x de l'électron i de la molécule u... L'interaction électrostatique entre les moments dipolaires permanents des deux molécules est négligée. En effet, cette interaction doit conduire à une modification sensiblement identique de l'énergie de l'état fondamental et de l'état excité.

En général, un seul terme reste dans l'interaction dipôle-dipôle. Par exemple pour une transition polarisée suivant l'axe x, le potentiel de perturbation se réduit à

$$V_{uv} = + \frac{e^2}{r_{uv}^3} \sum_{i,j} x_u^i x_v^j$$

Dans ce cas on a donc

$$W = \frac{e^2}{r_{uv}^3} \iint \Psi_u \Psi_v^* \left(\sum_{i,j} x_u^i x_v^j \right) \Psi_u^* \Psi_v \, d\tau_u \, d\tau_v$$

$$= \frac{1}{r_{uv}^3} \int \Psi_u \left(\sum_i e x_u^i \right) \Psi_u^* \, d\tau_u \int \Psi_v \left(\sum_j e x_v^j \right) \Psi_v^* \, d\tau_v$$

$$= \frac{1}{r_{uv}^3} M_u \cdot M_v$$

M_u et M_v sont les intégrales moment de transition des molécules u et v. Pour que la fonction d'onde de l'état excitonique stationnaire Ψ_I soit la plus basse en énergie (fig. IV-10-*b*), il faut choisir $M_u = -M_v$ (la relation

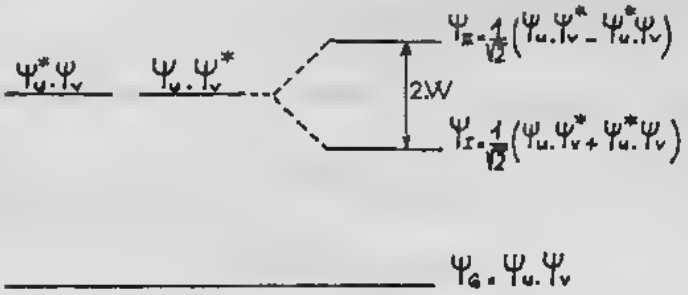


FIG. IV-10 *b*.

de phase entre les deux moments de transition peut être choisie arbitrairement). Si on choisit $M_u = + M_v$, Ψ_{II} correspondra à l'état de plus faible énergie. D'où

$$W = -\frac{M_u^2}{r_{uv}^3}$$

La largeur de bande de l'exciton est $|2\ W| = \frac{2\,M_u^2}{r_{uv}^3}$

Source . MNHN, Paris

Dans le cas général où les axes moléculaires sont orientés de façon quelconque par rapport au trièdre de référence *xyz*, l'énergie d'interaction devient

$$W = + \frac{M_u^2}{r_{uv}^3} (2 \cos \theta_u^x \cos \theta_v^x - \cos \theta_u^x \cos \theta_v^x - \cos \theta_u^y \cos \theta_v^y)$$

où θ_u^x, θ_u^y, θ_u^z sont les angles du vecteur $\vec{M}_u$ avec les axes $x\ y\ z$.

Remarquons que l'on aboutit au même résultat concernant l'énergie d'interaction si l'on utilise la relation classique d'interaction entre 2 dipôles M_u et M_v. La théorie quantique précédente présente cependant l'avantage de permettre de prévoir un certain nombre de conséquences pour les propriétés optiques (55).

b) *Règles de sélection.*

Les moments de transition du « dimère » sont donnés par les relations

$$M_I = \iint \Psi_G \, (\mathcal{M}_u + \mathcal{M}_v) \quad \Psi_I \, d\tau_u \, d\tau_v$$

$$M_{II} = \iint \Psi_v \, (\mathcal{M}_u + \mathcal{M}_v) \quad \Psi_{II} \, d\tau_u \, d\tau_v$$

où $\mathcal{M}_u$ et $\mathcal{M}_v$ sont les opérateurs moment dipolaire électrique correspondant aux molécules u et v

$$M_{I,\,II} = \frac{1}{\sqrt{2}} \iint \Psi_u \, \Psi_v \, (\mathcal{M}_u + \mathcal{M}_v) \, (\Psi_u \, \Psi_v^* \pm \Psi_u^* \, \Psi_v) \, d\tau_u \, d\tau_v$$

$$M_I = \frac{1}{\sqrt{2}} \int \Psi_v \, \mathcal{M}_u \, \Psi_v^* \, d\tau_v + \frac{1}{\sqrt{2}} \int \Psi_u \, \mathcal{M}_u \, \Psi_u^* \, d\tau_u$$

(les fonctions d'onde des états moléculaires sont orthogonales et normalisées). D'où

$$M_I = \frac{1}{\sqrt{2}} (M_u + M_v)$$

$$M_{II} = \frac{1}{\sqrt{2}} (M_u - M_v)$$

Pour le dimère de la figure IV-10-*a* on a choisi $M_u = - M_v$.
Donc $M_I = 0$

$$M_{II} = \frac{2 M_u}{\sqrt{2}}$$

Les forces oscillatoires f des transitions correspondantes sont donc

$$f = 0 \text{ pour } \Psi_G \rightarrow \Psi_I$$

$$f \text{ proportionnelle à } 2 M_v^2 \text{ pour } \Psi_G \rightarrow \Psi_{II}$$

soit $f_{dimère} = 2 f_{monomère}$.

Source : MNHN, Paris

On ne doit donc pas observer de changement d'intensité de la bande d'absorption quand on passe des deux molécules *u* et *v* séparées au dimère *u* — *v*. Ceci reste valable quelles que soient les orientations relatives des deux molécules *u* et *v*.

Pour le dimère de la figure IV-10-*a*, seul le niveau excitonique le plus haut peut être atteint par une transition de nature dipolaire électrique. Si l'orientation relative de *u* et de *v* est inversée, seul le niveau excitonique le plus bas peut être atteint.

Enfin pour une orientation quelconque des moments de transition des deux molécules *u* et *v*, les transitions vers les deux niveaux excitoniques sont permises. Les forces oscillatoires sont généralement différentes et le résultat est le dédoublement de la bande d'absorption (ou son élargissement) (55).

c) *Propriétés optiques du dimère.*

Dans le cas du dimère de la figure IV-10-*a*, on observe un effet hypsochrome par rapport au spectre d'absorption du monomère. Le dimère se désactive rapidement par collisions vers son niveau excitonique le plus bas qui est métastable ($f \simeq 0$). Donc le passage par l'état triplet T_1 devient plus probable que pour le monomère (on suppose que l'état triplet T_1 n'est pas dédoublé puisque la force oscillatoire de la transition $S_0 \rightarrow T_1$ est nulle pour le monomère).On doit donc observer une extinction de la fluorescence et une augmentation du rendement de phosphorescence.

Si les orientations relatives de *u* et *v* sont inversées, les effets contraires (extinction de la phosphorescence, augmentation du rendement de fluorescence) doivent être observées. Enfin tous les cas intermédiaires peuvent être observés pour une orientation relative quelconque des deux molécules *u* et *v* (55).

d) *Application à un homo-dinucléotide.*

Dans un dinucléotide (comme $A_{3'}p_{5'}A$ par exemple), les deux bases sont parallèles ($\theta_u^z = \theta_v^z = \frac{\pi}{2}$) et les moments de transition correspondant à la première bande d'absorption $\pi \rightarrow \pi^*$ forment un angle α. Dans ces conditions, l'énergie d'interaction devient

$$W = \frac{-M^2}{r^3} \cos \alpha$$

où M est le moment de transition du monomère (A) et *r* la distance entre les deux bases.

La séparation entre les deux niveaux excitoniques est donc $\frac{2M^2}{r^3} \cos \alpha$. Les moments de transition correspondant aux deux transitions (permises) du dinucléotide sont respectivement

$$M_I = M\sqrt{1 - \cos \alpha}$$

$$M_{II} = M\sqrt{1 + \cos \alpha}$$

Source : MNHN, Paris

Donc les forces oscillatoires de ces deux transitions sont proportionnelles respectivement à $M^2 (1 - \cos \alpha)$ et $M^2 (1 + \cos \alpha)$. De plus, les dinucléotides présentent une activité optique. Les forces rotationnelles R correspondant aux deux transitions précédentes sont respectivement (56);

$$R_1 = \frac{\pi r}{2 \lambda_0} M^2 \sin \alpha$$

$$R_2 = \frac{-\pi r}{2 \lambda_0} M^2 \sin \alpha$$

où λ_0 est la longueur d'onde de la transition dans le monomère.

e) *Extension à un polynucléotide en simple et en double hélice.*

Rappelons que les interactions de type excitonique devraient donner naissance à deux bandes d'énergie. Les interactions entre bases superposées donnent naissance à une bande excitonique, elle-même dédoublée par les interactions entre les bases d'un même plateau. Les règles de sélection, dérivées de la même façon que pour un dinucléotide, montrent que la composante $\pi \rightarrow \pi^*$ de la bande à 2600 Å du DNA doit être polarisée perpendiculairement tandis que la composante $n \rightarrow \pi^*$ (aux grandes longueurs d'onde) doit être polarisée parallèlement à l'axe de l'hélice.

2° Étude des propriétés optiques des dinucléosides phosphate et pyrophosphate $A_{3'}p_{5'}A$ et $A_{5'}pp_{5'}A$.

Si l'on compare le spectre d'absorption de $A_{3'}p_{5'}A$ et de $A_{5'}pp_{5'}A$ avec celui de leurs produits d'hydrolyse à pH 7, les variations relatives de leur coefficient d'extinction à 259 mμ sont respectivement de 12,5 et 19,2 % (57). Donc ces deux composés ont une structure secondaire due à l'empilement des bases (et non à la formation de liaisons hydrogène). Les longueurs d'onde d'absorption maximum de $A_{3'}p_{5'}A$ et $A_{5'}pp_{5'}A$ sont respectivement 258 et 261 mμ comparées à 259,5 mμ pour le monomère (adénosine monophosphate).

Les deux dinucléotides présentent un dichroïsme circulaire que l'on n'observe pas pour le mononucléotide. Dans les deux cas, on observe une bande de force rotationnelle positive ayant son maximum vers 270 mμ (58,59).

Les mesures de phosphorescence ont été effectuées sur des solutions aqueuses congelées à 77° K. Pour une même concentration en monomère ($6 \cdot 10^{-4}$ M), on obtient les intensités de phosphorescence relatives suivantes :

A	ApA	AppA
1	2	0,5

Le maximum du spectre d'excitation de la phosphorescence des deux dinucléotides est décalé d'environ 7 mμ vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celui de l'adénosine.

Le spectre de phosphorescence des deux dinucléotides, bien que présentant une structure vibrationnelle prononcée, est pratiquement

Source : MNHN, Paris

identique à celui de l'adénosine (fig. IV-11). Le temps de vie de l'état triplet phosphorescent est légèrement plus faible pour les dinucléotides (environ 1,9 s) que pour l'adénosine (2,3 s).

L'addition d'éthanol à une solution aqueuse de l'un quelconque des dinucléotides provoque les mêmes modifications que celles enregistrées sur l'adénosine seule :

1) L'intensité de phosphorescence est multipliée (III-2-*b*) par un facteur compris entre 3 et 4.
2) Déplacement bypsocbrome du spectre de phosphorescence et déplacement bathochrome du spectre d'excitation.
3) Angmentation du temps de vie de l'état triplet phosphorescent qui passe de 1,9 à 2,6 s pour les dinucléotides (2,3 à 2,9 s pour l'adénosine).

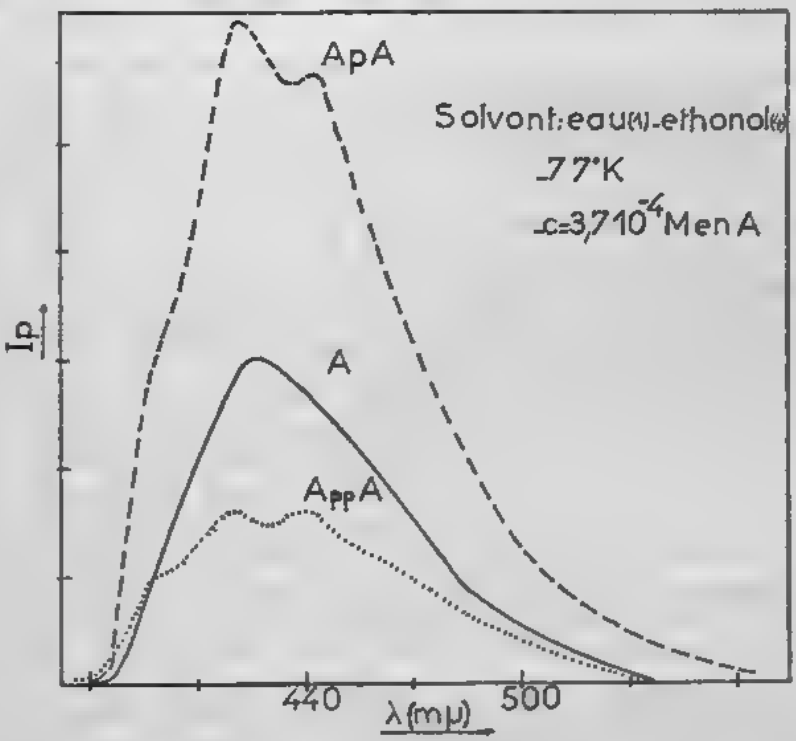


FIG. IV-11. — Spectres de phosphorescence de A, $A_s{\cdot}p_s{\cdot}A$ et $A_s\,pp_s{\cdot}A$.

Seule la structure vibrationnelle du spectre de pbosphorescence des dinucléotides n'évolue pas, contrairement à ce qui est observé avec l'adénosine. De ces résultats de phosphorescence, on peut conclure que l'énergie de l'état triplet le plus bas de l'adénosine et sa désactivation sont peu modifiés par la dimérisation. Seule la population de cet état est augmentée dans ApA) ou diminuée (dans AppA).

Source : MNHN, Paris

3° Comparaison des résultats expérimentaux avec les calculs théoriques.

La force oscillatoire correspondant à la première bande d'absorption de l'adénosine est $f = 0{,}30$ ce qui donne un moment de transition $M = 4$ Debye. La distance moyenne entre les deux bases dans les deux dinucléotides est de l'ordre de 3,4 Å.

Cas de A_3p_5A : on observe un déplacement hypsochrome du spectre d'absorption. Donc la bande excitonique de plus courte longueur d'onde a la force oscillatoire la plus grande. Cette bande a une force rationnelle négative ce qui impose que α soit compris entre 0 et 90 degrés. Par construction d'un modèle moléculaire, on peut constater que cet angle α doit être de l'ordre de 30 à 45 degrés (dans le poly A en simple hélice, l'angle entre les moments de transition de deux bases consécutives est de l'ordre de 36°).

L'énergie d'interaction calculée par la formule $W = -\frac{M^2}{r^3}\cos\alpha$ a alors une valeur d'environ $0{,}34.10^{-12}$ ergs, soit une différence entre les deux niveaux excitoniques correspondant à environ 1700 cm^{-1} ce qui représente approximativement 11 mμ à 260 mμ. Les deux bandes d'absorption de A_3p_5A doivent donc avoir leurs maximums à 254 mμ et 265 mμ. En réalité, à la distance de 3,4 Å, les deux dipôles ne peuvent être considérés comme ponctuels. Il faudrait donc faire le calcul des monopôles de transition, localisés sur les différents atomes de chaque base, et des énergies d'interaction entre ces monopôles. Le calcul, effectué par Tinoco et ses collaborateurs, donne une interaction de 2.000 cm^{-1} environ (59). Le calcul simplifié effectué plus haut fournit donc une très bonne approximation de cette énergie.

La phosphorescence du dinucléoside phosphate A_3p_5A est excitée dans la bande de plus grande longueur d'onde. Le déplacement de 7 mμ observé dans le maximum d'excitation, par rapport au monomère, est en bon accord avec la valeur de 6 mμ environ calculée précédemment.

D'autre part, le temps de vie radiatif de l'état excitonique le plus bas est plus long que celui du premier état singulet excité du monomère car la force oscillatoire de la transition correspondante est plus faible. La transition vers l'état triplet T_1 se fait donc avec une plus grande probabilité ce qui entraîne l'augmentation observée du rendement de phosphorescence.

Cas de A_5pp_5A : dans ce dinucléoside pyrophosphate, la bande d'absorption est déplacée vers les grandes longueurs d'onde (environ 1 mμ) par rapport à celle du monomère. Donc la bande excitonique de plus grande longueur d'onde a la force oscillatoire la plus grande. Sa force rotationnelle étant positive, l'angle α doit être compris entre 90 et 180 degrés. La grande flexibilité de la liaison pyrophosphate, par rapport à la liaison phosphate $3' - 5'$, permet en effet de construire un modèle de A_5pp_5A correspondant à un angle de l'ordre de grandeur de 150°, représenté schématiquement sur la figure IV-12. L'énergie d'interaction semble du même ordre de grandeur que pour A_3p_5A, le maximum du spectre d'excitation de la phosphorescence se déplaçant vers les grandes longueurs d'onde de la même quantité (environ 7 mμ) par rapport à celui du monomère.

Source : MNHN, Paris

Mais, à la différence de A_3p_5A, le temps de vie radiatif de l'état excitonique le plus bas est plus court que celui du premier état singulet excité du monomère (la force oscillatoire de la transition est plus grande). La transition vers l'état triplet se faisant alors avec une probabilité plus faible, on observe une diminution du rendement de phosphorescence.

Dans les deux cas, l'énergie d'interaction excitonique a été évaluée à environ 1 700 cm^{-1}. L'ordre de grandeur du temps $\mathcal{T}$ nécessaire à l'énergie d'excitation pour migrer d'une molécule à l'autre est donné par la relation (60) :

$$\mathcal{T} = \hbar \times W^{-1}$$

où W est l'énergie d'interaction en ergs.

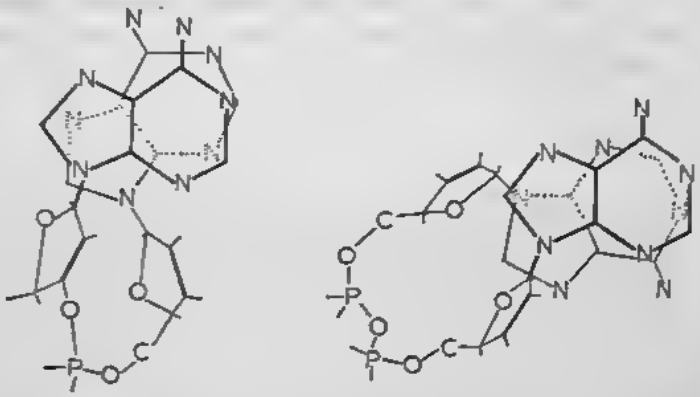


FIG. IV-12.

L'application de cette relation donne dans le cas présent une valeur $\mathcal{T} = 3 \cdot 10^{-15}$ s. La vitesse de migration de l'énergie dans ce cas d'interaction excitonique est donc très élevée. Cependant il ne faut pas oublier que le temps de vie de l'état singulet est faible (10^{-8} s) comparé à celui de l'état triplet (jusqu'à quelques secondes) et qu'une énergie d'interaction très faible entre états triplets peut permettre une migration beaucoup plus efficace de l'énergie.

C. — ÉTUDE DES INTERACTIONS ENTRE LES BASES D'UN MÊME PLATEAU

Les résultats obtenus au paragraphe A de ce chapitre sont relatifs aux interactions entre bases superposées dans les dinucléotides. L'étude des interactions entre bases d'un même plateau, liées par liaisons hydrogène, est limitée par la difficulté de séparer les effets dus à l'empilement de ceux dus à la formation des liaisons hydrogène. Cependant le problème peut être abordé en faisant appel à des homo-oligonucléotides qui peuvent donner naissance, dans certaines conditions de milieu, à des doubles ou triples hélices, ou en utilisant des solutions aqueuses congelées à 77° K qui, comme nous l'avons vu au chapitre III, ont la propriété d'exclure les molécules de solutés du réseau cristallin de la glace et de les concentrer dans les cavités de ce réseau.

Source : MNHN, Paris

1° Étude des associations entre bases ou nucléosides puriques et pyrimidiques en solutions aqueuses congelées.

La formation de liaisons hydrogène et la destruction des agrégats entraînent des modifications caractéristiques de la phosphorescence de solutions aqueuses des nucléosides, congelées à 77° K (paragraphe III-C-2-b) : augmentation de l'intensité de phosphorescence, du temps de vie de l'état triplet phosphorescent, apparition d'une structure vibrationnelle et déplacement hypsochrome du spectre de phosphorescence.

Nous avons cependant vu, au paragraphe A-4, que dans les mélanges de deux nucléosides, on pouvait obtenir un transfert triplet-triplet de l'énergie d'excitation. Ce transfert nécessitant un recouvrement des orbitales moléculaires, les expériences indiquent qu'en solution aqueuse congelée se forment des agrégats mixtes plutôt que des complexes par liaisons hydrogène. C'est le cas pour les mélanges A + T, G + T, AcC + T, C + T par exemple.

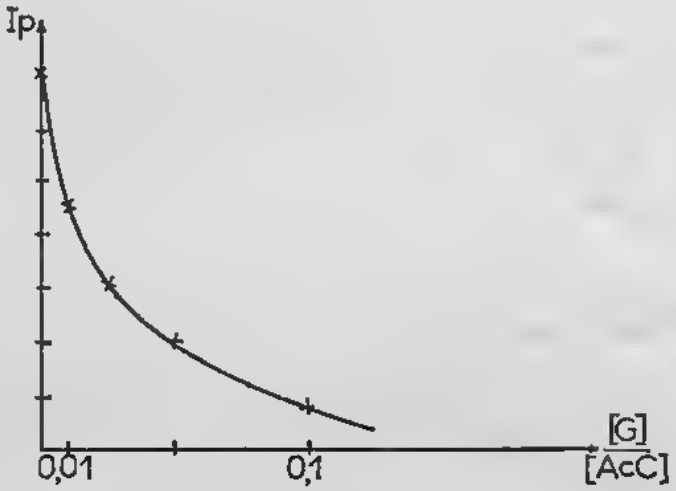
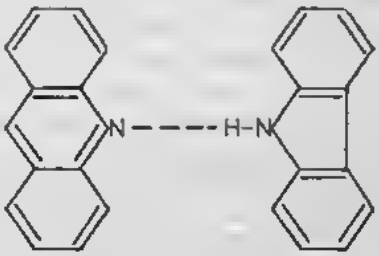


FIG. IV-13. — Extinction de la phosphorescence de AcC ($c = 1{,}5.10^{-4}$ M) par G en solution aqueuse congelée à 77° K.

Dans certains cas cependant, le comportement, en émission, du mélange de certains nucléosides ne peut pas s'expliquer seulement par un tel transfert d'énergie. C'est ainsi, par exemple, que l'addition d'uridine entraîne l'extinction de la phosphorescence de l'adénosine sans qu'apparaisse la phosphorescence de l'uridine. Cette extinction pourrait s'expliquer (paragraphe C-2 ci-dessous) comme dans le complexe poly A + 2 poly U par un transfert d'énergie singulet-singulet. Cependant la phosphorescence de l'acétylcytosine (AcC) est très fortement diminuée par la présence de faibles proportions (inférieures à 0,01) de guanosine (G) sans qu'apparaisse la phosphorescence caractéristique de G (fig. IV-13), ce qui élimine un transfert triplet-triplet. Simultanément, la fluorescence de AcC disparaît. Or le niveau singulet excité le plus bas de AcC a une énergie inférieure à celle de G, c'est-à-dire que l'extinction de la fluorescence de AcC par G ne peut pas

Source : MNHN, Paris

s'expliquer par un transfert singulet-singulet. Les résultats obtenus sur ces mélanges AcC + G sont analogues à ceux obtenus par El-Bayoumi et Kasha (61) sur des mélanges acridine-carbazole. Dans ce dernier cas, on observe en effet une extinction de la fluorescence et de la phosphorescence du carbazole par l'acridine dans un solvant hydrocarboné à 77° K mais non dans l'éthanol à 77° K. Aucune augmentation de l'émission de l'acridine n'est observée. L'émission totale du N-éthylcarbazole n'est pas modifiée par l'addition d'acridine quel que soit le solvant. Ces observations ont été interprétées par la formation d'un complexe par liaisons hydrogène (61) :



Ce complexe joue le rôle de piège pour l'énergie d'excitation même pour de faibles rapports (0,1) entre les concentrations de l'acridine et du carbazole (61). On peut donc penser que dans les mélanges A + U ou AcC + G se forment des complexes par liaisons hydrogène A...U ou AcC...G non phosphorescents. L'énergie d'excitation est délocalisée dans les agrégats formés au cours de la congélation des solutions aqueuses; la présence d'un seul complexe par liaisons hydrogène, dans ces agrégats, joue le rôle de piège pour cette énergie délocalisée. Cette hypothèse est renforcée par le fait que les observations reportées plus haut ne sont valables que lorsque les deux partenaires du mélange sont susceptibles de s'apparier dans un acide nucléique. Ainsi, alors que A, AcC et G dans l'état triplet peuvent transférer leur énergie vers la thymidine, seul A et U, G et AcC ou G et BrC forment des complexes non phosphorescents. Quant à la nature des liaisons hydrogène entre les deux nucléosides appariés, elle peut être déduite de celle observée dans les cristaux obtenus par évaporation de solutions aqueuses concentrées grâce à l'étude de la diffraction des rayons X. Il a été ainsi établi que les liaisons hydrogène formées dans la paire guanine-cytosine (62) sont identiques à celles formées dans les acides nucléiques (schéma de Watson et Crick). Par contre, dans les cristaux obtenus par évaporation de solutions aqueuses d'adénine (9-éthyl) et de thymine (1-méthyl) (63), les liaisons hydrogène se font entre N_{10} et N_3 de l'adénine et O_8 et N_3 de la thymine respectivement. Dans les acides nucléiques, ces liaisons se font respectivement entre N_{10} et N_1 de l'adénine et O_8 et N_3 de la thymine. Si des liaisons hydrogène se forment dans les solutions aqueuses congelées à 77° K, elles se font probablement suivant le premier schéma.

2° Interactions entre l'acide triadénylique (A_3) et l'acide polyuridylique (poly U).

Les études d'hypo- et hyperchromie ont montré que les oligonucléotides d'adénine peuvent former avec le poly U des doubles ou triples hélices suivant la nature des sels contenus dans la solution aqueuse (64).

Source : MNHN, Paris

Le poly U n'est pas phosphorescent. La phosphorescence de A_3 est analogue à celle de l'adénosine (temps de vie 2,3 s en solution aqueuse) et se modifie de la même façon par formation de liaisons H avec l'éthanol. Dans les conditions où A_3 et poly U forment un complexe en double hélice (solution aqueuse 0,1 M en chlorure de sodium), on observe l'apparition d'une structure vibrationnelle et le déplacement hypsochrome du spectre de phosphorescence, dus à la formation de liaisons H, de même qu'une légère augmentation du temps de vie qui passe de 2,3 à 2,5 s. Mais simultanément l'intensité de phosphorescence décroît ce qui traduit l'apparition d'un autre phénomène (probablement un transfert de l'énergie d'excitation de A vers U par l'intermédiaire des états singulets). Dans la double hélice A_3 + poly U, les liaisons H formées sont du type Watson et Crick.

Dans les conditions où l'on forme la triple hélice (0,1 M NaCl + 0,0001 M $MgCl_2$), la phosphorescence de A_3 a pratiquement complètement disparu et la faible intensité de phosphorescence enregistrée ($\lambda_{max.} \simeq 425$ mμ) ne permet pas de faire de mesures de déclin. L'addition de 3 % d'éthanol à la solution restaure la phosphorescence de A_3 ce qui prouve que l'éthanol détruit le complexe A_3 + 2 poly U. Si l'on multiplie par deux la quantité de poly U contenue dans la solution aqueuse 0,1 M NaCl, la phosphorescence est pratiquement éteinte ce qui prouve que l'on peut former le complexe (A_3 + 2 poly U) même en l'absence de $MgCl_2$ mais que le complexe se détruit avant 0° C ce qui entraîne l'absence d'hypochromicité.

Dans le cas de la triple hélice A_3 + 2 poly U, les liaisons H entre A_3 et la deuxième chaîne de poly U se font par l'intermédiaire du doublet libre en N_7 de l'adénine.

Des résultats analogues ont été obtenus par SHULMAN et collaborateurs (41) qui ont montré que l'addition de poly U à une solution aqueuse de poly A, dans les conditions où se forme la triple hélice ($MgCl_2$), entraîne une diminution de la phosphorescence et de la fluorescence du poly A à 77° K. Phosphorescence et fluorescence ont complètement disparu quand on a formé le complexe poly A + 2 poly U. Le remplacement de poly U par poly I (I = inosine) donne les mêmes résultats.

De même le poly A vers pH $\simeq$ 5 forme une double hélice (quand la moitié environ des noyaux puriques a fixé un proton). Cette double hélice se fait par l'intermédiaire de liaisons H impliquant l'azote N_7. Dans ces conditions, on observe encore une extinction de la fluorescence et de la phosphorescence du poly A (41). Cette extinction, comme pour poly A + 2 poly U, semble donc liée à la formation de liaisons hydrogène impliquant l'azote N_7.

Enfin, les interactions entre poly G et poly C en solution aqueuse entraînent une extinction de la phosphorescence du poly G (42) analogue à celle observée sur des solutions aqueuses congelées de guanosine + cytidine.

D. — CONCLUSION

Le transfert de l'énergie d'excitation optique peut se faire dans deux directions; entre bases superposées d'une part et entre bases d'un même plateau d'autre part.

Source : MNHN, Paris

Entre bases superposées différentes, nous avons pu montrer, dans un certain nombre de cas, que le transfert se faisait entre les niveaux triplets des deux bases. Dans certains dinucléotides, le transfert d'énergie a lieu sans que l'on puisse distinguer entre transferts singulet-singulet et triplet-triplet. Cependant, l'ordre d'énergie décroissante de l'état triplet des nucléosides est le suivant

$$AcC > G > A > C, \quad U > T > BrC > BrU$$

Le transfert se fait d'autant mieux que les états triplets des deux nucléosides sont plus séparés énergétiquement. Ainsi le transfert d'énergie se fait mieux dans G_3p_5C que dans A_3p_5C, dans AppBrC que dans AppC, etc. Il semble que le transfert de l'énergie d'excitation optique se fasse par l'intermédiaire des états triplets. La modification chimique d'une base peut, soit accentuer le transfert (par exemple dans AppBrC), soit l'inverser (par exemple dans AppAcC). Ce transfert triplet-triplet nécessite l'existence de forces d'échange électronique dues au recouvrement des orbitales π de deux bases superposées. Ces forces contribuent évidemment à assurer la stabilité d'une hélice et s'ajoutent aux forces classiques de Van der Waals-London.

Si les bases superposées sont identiques, une interaction de type excitonique a pu être démontrée. Cette interaction entraîne un transfert très rapide de l'énergie d'excitation (10^{-14}s dans l'hypothèse d'un couplage fort).

Enfin entre bases d'un même plateau, le rôle essentiel est joué par les liaisons hydrogène. Ce rôle sera précisé au Chapitre V dans l'étude de l'influence des interactions par liaisons hydrogène sur certaines réactions photochimiques.

L'existence d'une délocalisation de l'énergie a été confirmée par un certain nombre d'auteurs. Dans le cas de colorants liés à l'ADN par intercalation entre deux plateaux de bases, G. Weil et M. Calvin ont pu montrer que la fluorescence de l'acridine ou de la proflavine pouvait être excitée dans la bande d'absorption de l'ADN (260 mμ) (65). L'étude en fonction de la concentration en colorant semble montrer que l'excitation délocalisée est susceptible d'être captée par une molécule de colorant qui peut alors fluorescer (66). Bersohn et Isenberg (40) ont avancé l'hypothèse de deux excitons triplets indépendants dans le DNA : l'un correspondant à la guanine, l'autre à l'adénine. Cette hypothèse semblait confirmée par deux faits expérimentaux :

1) l'extinction de la phosphorescence de l'ADN par des ions paramagnétiques (Mn^{++}) ayant pénétré à l'intérieur de la double hélice (40).

2) l'apparition d'une fluorescence retardée de colorants intercalés entre deux plateaux de bases, cette fluorescence retardée étant le résultat du transfert de l'énergie d'un exciton triplet du DNA à une molécule de colorant initialement dans son état fondamental et qui se trouverait portée dans son état singulet (67).

En fait nos propres expériences sur un dinucléotide comme G_3p_5A montrent que l'énergie d'excitation d'une guanine est transférée avec un très grand rendement vers une adénine voisine, par l'intermédiaire des

Source : MNHN, Paris

états triplets des deux bases. La phosphorescence de l'ADN semble être due à la superposition d'au moins deux émissions de phosphorescence dont les temps de vie varient avec les auteurs et les échantillons : 1,9 s et 0,7 s selon Bersohn et Isenberg (40), 1,5 et 0,3 s selon Shulman et collaborateurs (41). Les résultats les plus récents de ces derniers auteurs semblent montrer que la phosphorescence la plus importante ($\tau = 0{,}3$ s) est celle de la thymine. Cette observation est en accord avec nos propres résultats montrant que la thymine, dont l'état triplet est le plus bas, doit être le dernier site de localisation de l'énergie.

Source : MNHN, Paris

Chapitre V

RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES

Nous avons vu au chapitre précédent que les interactions entre les bases superposées, et même entre les bases d'un même plateau, entraînaient un transfert de l'énergie d'excitation optique. Un tel transfert doit conduire dans un oligo-, un polynucléotide, un acide nucléique, à une localisation de l'énergie d'excitation au niveau de certaines bases qui peuvent alors subir une transformation photochimique.

A. — RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES

Avant d'aborder l'étude de l'influence du transfert sur les réactions photochimiques des associations de bases, il est nécessaire de bien connaître ce qui se passe au niveau des constituants.

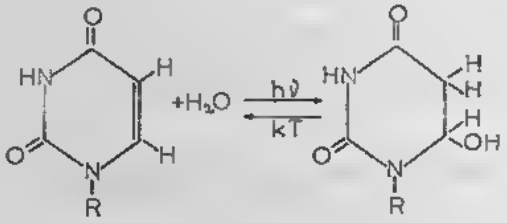
1° Rappel des résultats essentiels obtenus sur les bases, nucléosides, nucléotides et oligonucléotides pyrimidiques en solution aqueuse.

Le nombre de travaux consacrés à ces études est impressionnant. La synthèse la plus récente est celle de Shugar (68) dans « Photochemistry of proteins and nucleic acids » (1964). Deux réactions essentielles ont lieu lorsque l'on expose les dérivés pyrimidiques des acides nucléiques aux radiations de l'ultraviolet moyen ($\lambda > 250$ mμ) : hydratation de la double liaison 5-6 et dimérisation avec formation d'un cycle cyclobutane impliquant aussi les liaisons 5-6. Le niveau singulet excité le plus bas présente une structure ionique qui intervient vraisemblablement dans la réaction de fixation de l'eau sur la double liaison 5-6 des dérivés pyrimidiques. Par contre, le niveau triplet possède une structure avec des électrons localisés sur deux atomes et doit intervenir dans le mécanisme radicalaire de la dimérisation.

Source . MNHN, Paris

a) *Hydratation.*

C'est la réaction photochimique essentielle de la cytidine, de l'uracile et de leurs dérivés en solution aqueuse à 20° C.



Cette réaction d'hydratation est réversible, l'énergie d'activation de la réaction inverse étant de l'ordre de 15 Kcal/mole (cytidine) ou 23 Kcal/mole (uracile). Les dérivés de l'uracile (par exemple le 1,3-diméthyluracile) donnent un photoproduit suffisamment stable pour que l'étude R. M. N. puisse être faite. La structure de ce photoproduit a ainsi été établie de façon non équivoque : 5-hydro, 6-hydroxy-uracile. En absorption, l'hydratation se traduit par la disparition de la bande d'absorption de l'uracile à 260 mμ.

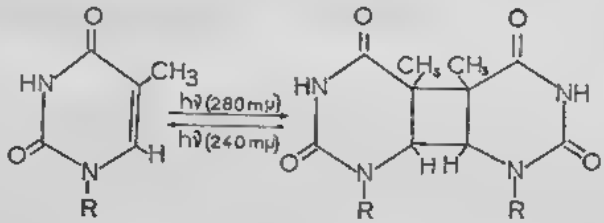
Dans le cas de la cytosine, une désamination partielle se produit, conduisant à la formation d'uracile et d'uracile hydraté en 5-6. L'hydratation de la double liaison 5-6 précède sans doute la désamination.

L'hydratation de la double liaison 5-6 de la cytidine conduit à la disparition de la bande d'absorption à 270 mμ et à l'apparition d'une nouvelle bande vers 240 mμ (68) (*vide infra*).

La thymine en solution aqueuse à 20° C ne donne pratiquement pas de réaction photochimique.

b) *Dimérisation.*

Une dimérisation se produit suivant le schéma ci-dessous lorsque l'on irradie des solutions aqueuses congelées de thymine ou d'uracile (ou de leurs dérivés).



Plusieurs isomères du dimère sont évidemment possibles suivant les orientations relatives des deux monomères au moment de la dimérisation. La bande d'absorption de la thymine à 260 mμ disparaît au cours de la dimérisation, le dimère n'absorbant que dans l'ultra-violet plus lointain ($\lambda_{max.} < 220$ mμ). Le dimère est stable même en milieu fluide. La réaction inverse de la dimérisation peut cependant être réalisée par irradiation du dimère à 240 mμ en milieu fluide.

Source : MNHN, Paris

En solution aqueuse, une faible proportion d'uracile (3 à 5 %) se dimérise. Mais seul l'acide orotique (uracile-6-carboxyle) se dimérise en milieu fluide avec un très bon rendement (71). L'effet protecteur de l'oxygène et des ions des métaux de transition (paramagnétiques) a permis de penser que la dimérisation avait pour intermédiaire l'état triplet de l'une au moins des deux molécules impliquées (82).

La réaction de dimérisation de la thymine peut être réalisée en solution aqueuse en utilisant le dinucléotide de thymine TpTp (70). Dans ce composé, les deux noyaux pyrimidiques sont évidemment assez proches l'un de l'autre pour que la réaction puisse avoir lieu. Le rendement en dimère est grand (70 %) quand on irradie avec des radiations de longueur d'onde 280 mμ. Le dimère irradié vers 240 mμ redonne le produit de départ. Par irradiation du dinucléotide avec des radiations de longueurs d'onde comprises entre 240 mμ et 280 mμ, on obtient un état stationnaire qui dépend de la longueur d'onde.

2° Étude des réactions photochimiques des bases et nucléosides puriques en solution aqueuse congelée à 77° K : photo-éjection d'électrons.

Les dérivés puriques en solution aqueuse sont pratiquement insensibles à des doses de rayonnement ultraviolet qui transformeraient complètement les dérivés pyrimidiques. Cependant ces dérivés puriques peuvent jouer un rôle photochimique important lorsqu'ils sont incorporés dans un acide nucléique. Nous avons vu qu'ils étaient capables de transférer leur énergie d'excitation optique vers les bases pyrimidiques (Chapitre IV). Ils sont sans doute susceptibles de donner lieu à des réactions photochimiques caractéristiques mais réversibles et inobservables en milieu fluide. C'est pourquoi nous avons entrepris une étude de la photochimie de solutions aqueuses, congelées à 77° K, des dérivés puriques (72), étude qui a été réalisée à l'aide de deux techniques : phosphorescence et résonance paramagnétique électronique.

L'irradiation à des longueurs d'onde supérieures à 250 mμ de solutions aqueuses congelées à 77° K de purine, adénosine ou guanosine entraîne l'apparition d'un signal R. P. E. dissymétrique à $g \simeq 2$ (Fig. V-7). Ce signal diminue ensuite d'intensité (15 à 20 %) lorsque l'on soumet l'échantillon à l'action de radiations visibles de longueurs d'onde supérieures à 450 mμ (Fig. V-7). Cette diminution est caractéristique de la présence d'électrons piégés dans le réseau cristallin de la glace (91).

L'irradiation de la purine et de ses dérivés a donc provoqué l'éjection d'électrons qui ont été piégés dans le réseau de la glace : $Pu \longrightarrow Pu^+ + e^-$. Ces électrons peuvent sortir des pièges sous l'action des radiations visibles et être fixés soit par le solvant, soit par les ions Pu^+, soit par des molécules du soluté. La photoéjection d'électrons entraîne une extinction très rapide de la phosphorescence de la purine, la guanosine ou l'adénosine. Cette extinction est due aux ions-radicaux Pu^+ et aux électrons, formés par l'irradiation, qui entraînent une désactivation non radiative très rapide de l'état triplet phosphorescent.

Le rôle de l'état triplet le plus bas dans la photoéjection d'électrons est démontré par l'absence de ce phénomène pour des composés peu ou pas phosphorescents comme la xanthosine (2,6-dioxo 9-ribosylpurine) ou les

Source : MNHN, Paris

dérivés pyrimidiques (cytosine, cytidine, uracile, thymine). Ce rôle sera précisé par l'étude de la compétition entre photosensibilisation du solvant et photoéjection (*vide infra*). La photoéjection d'électrons peut s'interpréter par un mécanisme d'absorption biphotonique (86, 90).

L'état triplet, de type $\pi \rightarrow \pi^*$, a une énergie de l'ordre de 3,4 *e*V pour la purine, la guanosine et l'adénosine (Chapitre III). Or les calculs théoriques (73) ont montré que ce sont les électrons π de ces composés qui ont le plus faible potentiel d'ionisation, mais que l'énergie d'ionisation est de l'ordre de 8 *e*V. L'éjection d'électrons par des radiations de longueurs d'onde supérieures à 250 mμ (5 *e*V) ne peut donc pas se faire à partir du niveau excité singulet ou triplet le plus bas. Par contre, elle peut se faire à partir d'un niveau excité supérieur atteint par absorption consécutive de deux photons, l'espèce intermédiaire absorbant le deuxième photon étant, par exemple, la molécule dans son état triplet.

Dans le cas des dérivés pyrimidiques, l'irradiation en solution aqueuse congelée à 77° K provoque, avec un faible rendement, l'apparition d'un signal R. P. E. à $g \simeq 2$ sur lequel la lumière visible n'a aucune action. Ce signal est certainement dû aux radicaux formés par fixation d'un atome d'hydrogène en position 6, comme cela est observé au cours de l'irradiation de poudres microcristallines.

3° Formation transitoire de composés métastables au cours de l'irradiation.

La possibilité de formation de composés métastables (autres que le produit d'hydratation des bases pyrimidiques), au cours de l'irradiation ultraviolette des acides nucléiques, a été envisagée pour expliquer les mutations induites par ces radiations. Ces composés métastables pourraient être soit des formes tautomères de la structure usuelle des bases, soit des formes ionisées, par capture ou perte de proton. Une base sous une forme tautomère ou une forme ionisée peut par exemple s'apparier, au cours de la replication de l'ADN, avec une base différente de son partenaire habituel et entraîner ainsi une mutation (74).

a) *Mise en évidence de formes tautomères de dérivés pyrimidiques.*

Les études spectroscopiques (U. V., I. R., R. M. N.) effectuées sur les bases et les nucléosides puriques et pyrimidiques ont montré que ces composés en solution aqueuse existaient de façon prédominante sous une seule forme. Lorsqu'il existe un substituant NH_2, celui-ci a la structure amine (et non imine); un substituant hydroxyle existe toujours sous la forme cétone (et non énol).

Avant d'étudier la possibilité d'une photo-tautomérisation, il était donc nécessaire de connaître les caractéristiques spectrales des formes tautomères que l'on pouvait attendre.

— *Formes tautomères de l'uracile.*

Nous avons déjà vu au Chapitre III (paragraphe B-1) qu'il existait sans doute, en très faible proportion, dans une solution aqueuse d'uracile, une forme tautomère ayant des propriétés d'absorption et de phosphorescence caractéristiques. Nous avons attribué à cette forme tautomère la structure 2-hydroxy, 4-oxopyrimidine.

Source . MNHN, Paris

Lorsque l'uracile est substitué en N_1, comme dans l'uridine, cette forme tautomère ne peut plus exister. Elle ne présente donc que peu d'intérêt en ce qui concerne les acides nucléiques.

— *Mise en évidence de formes tautomères de la cytosine et de la cytidine.*

D'après les calculs théoriques basés sur les énergies de résonance des différentes formes tautomères (74), la base ayant la plus grande probabilité d'exister en solution sous une forme tautomère est la cytosine. L'étude de la phosphorescence ne permet pas de conclure à l'existence ou à la non existence de formes tautomères. Le spectre d'absorption de la cytosine varie quand la composition du solvant varie (mélange eau-éthanol ou éthanol-éther) (fig. V-1). A la diminution de l'intensité du maximum à 267 mμ correspondent l'apparition progressive d'un maximum vers 240 mμ et une augmentation plus faible de la densité optique vers 285 mμ. L'étude par spectrométrie différentielle d'une solution aqueuse de cytosine (pH ≃ 6) en fonction de la température (entre 20 et 70° C) montre un effet hypochrome maximal vers 265 mμ et un effet hyperchrome maximal à 240 et 286 mμ. Des variations analogues sont observées avec la 1-méthylcytosine et la cytidine pour lesquelles il existe déjà en solution aqueuse un épaulement vers 240 mμ. On peut donc envisager l'existence de trois formes tautomères de la cytosine : l'une, prédominante en solution aqueuse ($\lambda_{max.} = 267$ mμ) et deux autres en faibles proportions ($\lambda_{max.} = 240$ et 285 mμ) (75).

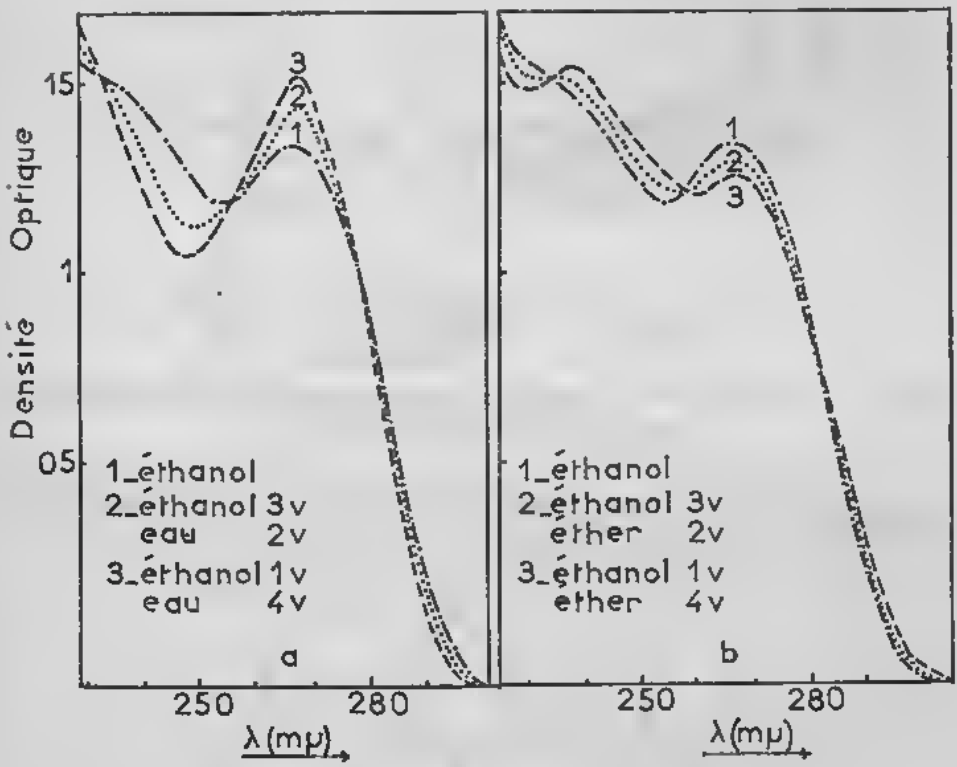


FIG. V-1. — Variations du spectre d'absorption de la cytosine $c = 2{,}5.10^{-4}$ M en fonction de la nature du solvant.

Source : MNHN, Paris

La modification de la nature du solvant ou de la température entraîne un déplacement de l'équilibre entre ces différentes formes. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de la sensibilité spectrale de la réaction photochimique de la cytosine et de dérivés substitués avec l'éthanol. En effet, la cytosine, optiquement excitée à 20° C en solution alcoolique, donne naissance à un photoproduit ayant une bande d'absorption caractéristique (fig. V-2-*a*) (76) : $\lambda_{max.} = 305$ mμ, $\varepsilon_{max.} = 1{,}5 \cdot 10^4$. Le spectre d'action a son maximum vers 240 mμ (fig. V-2-*b*). Si l'on fait varier la composition du solvant, le maximum de sensibilité est d'autant plus accentué que le coefficient d'extinction à 240 mμ est plus grand (fig. V-2-*b*). Le photoproduit semble donc obtenu à partir de la forme tautomère absorbant à 240 mμ. La 3-méthylcytosine dans l'éthanol donne aussi un photoproduit : $\lambda_{max.} = 309$ mμ. Avec la cytidine, un pbotoproduit absorbant vers 310 mμ est obtenu par irradiation en solution alcoolique, mais cette réaction n'est pas la seule à intervenir.

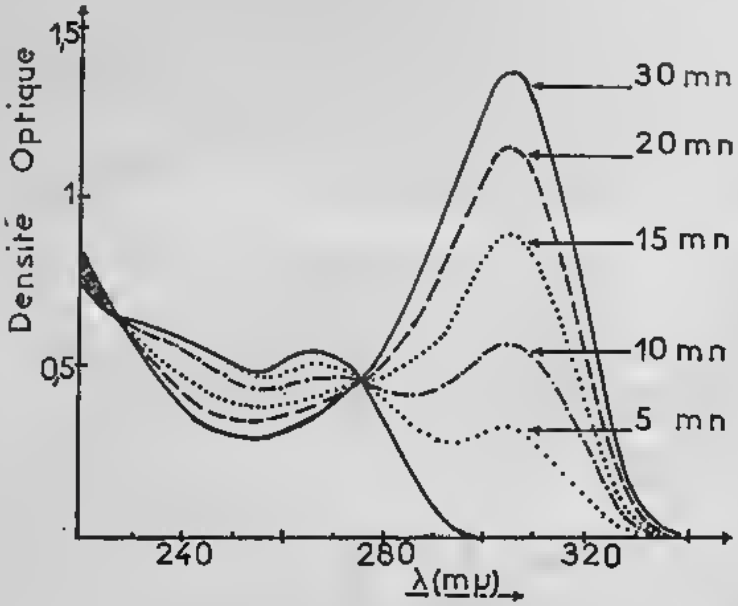
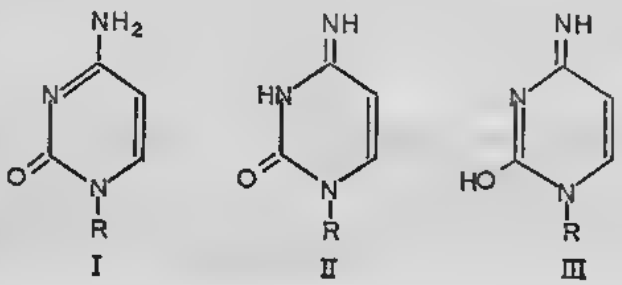


FIG. V-2 *a*. — Variations du spectre d'absorption de la cytosine (10^{-4} M) dans l'éthanol en fonction de la durée d'irradiation.

Les trois formes tautomères possibles pour la cytosine substituée en N_1 (1-méthylcytosine ou cytidine) sont représentées ci-dessous :



Source : MNHN, Paris

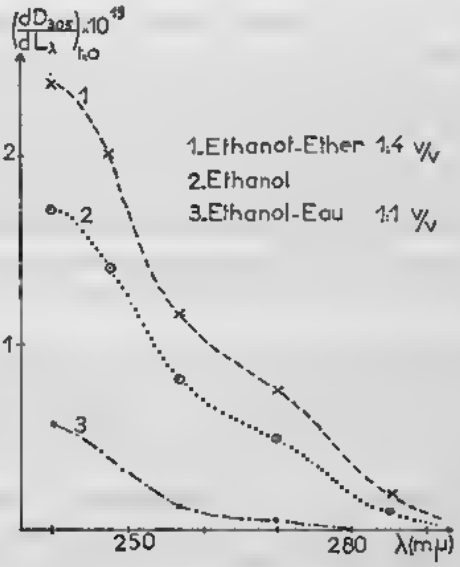


FIG. V-2 *b*. — Spectre d'action de la réaction photochimique de la cytosine.

La forme I est la forme prédominante en solution aqueuse. Une conjugaison du type III entraînant toujours un effet hypsochrome par rapport à une conjugaison du type II, la forme III est sans doute la forme tautomère absorbant vers 240 mμ. La forme tautomère III a pu être synthétisée sous forme de dérivé méthylé (1-méthyl 2-méthoxy 4-iminopyrimidine). Son spectre d'absorption dans l'éthanol est très voisin du spectre d'action de la réaction photochimique de la cytosine dans l'éthanol (fig. V-2-*c*).

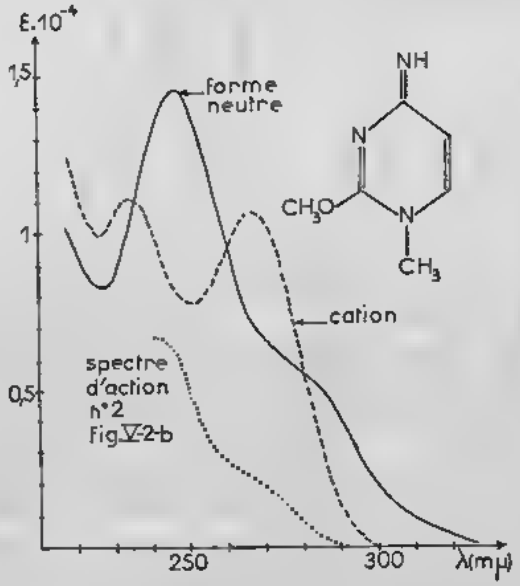


FIG. V-2 *c*. — Spectres d'absorption 1-méthyl 2-méthoxy 4-iminopyrimidine dans l'éthanol.

Source . MNHN, Paris

L'irradiation de ce dérivé en solution alcoolique à 20° C donne naissance à un photoproduit analogue à celui de la cytosine ($\lambda_{max.} = 318$ mμ). Ces expériences confirment l'identification de la forme tautomère de la cytosine absorbant à 240 mμ à la forme III. Cette forme III serait donc responsable de la réaction photochimique de la cytosine avec l'éthanol. Quant à la nature du photoproduit obtenu dans l'éthanol, elle est encore mal connue. Il résulte probablement de l'ouverture du cycle pyrimidique avec addition d'une molécule d'alcool et sans doute élimination d'ammoniac (comme le montre le test au réactif de Nessler). La rupture du cycle doit avoir lieu entre N_1 et C_2 (ou N_1 et N_6) comme dans le cas de la 2-méthoxy 4-amino pyrimidine (77).

Les essais de mise en évidence, par spectrophotométrie d'absorption, d'une photo-tautomérisation dans le cas de la cytosine ont échoué, même en effectuant les irradiations à 77° K. La difficulté essentielle réside dans le recouvrement des spectres d'absorption des différentes formes tautomères comme nous venons de le voir précédemment. Nous avons donc essayé de trouver un composé dérivé de la pyrimidine qui présente deux formes tautomères aisément séparables par leurs spectres d'absorption. Seule l'isocytosine répond à ces impératifs. Pour le 2-thiouracile, les deux formes tautomères ont des spectres d'absorption très voisins.

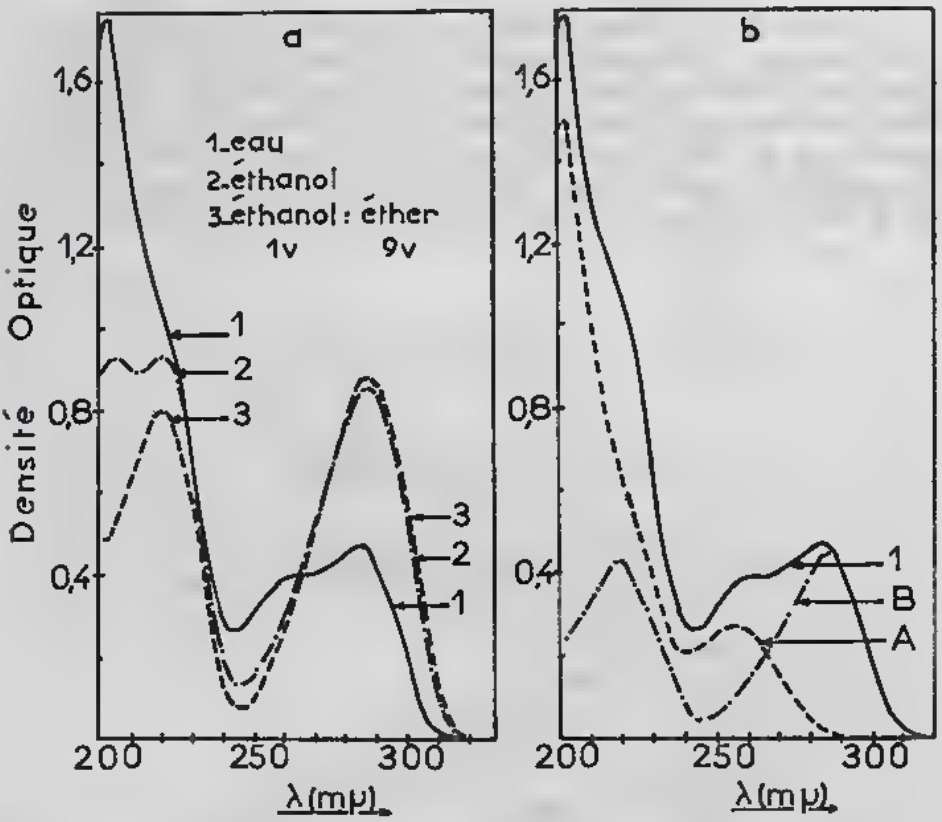


Fig. V-3 *a*. — Spectres d'absorption de l'isocytosine dans les trois solvants indiqués.
Fig. V-3 *b*. — Décomposition du spectre d'absorption de l'isocytosine dans l'eau.

Source : MNHN, Paris

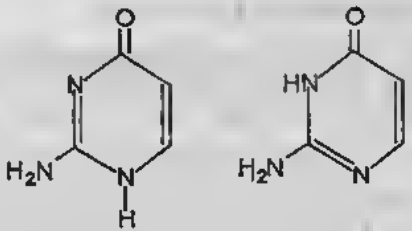
— *Formes tautomères de l'isocytosine.*

L'existence de deux formes tautomères en équilibre, dans les solutions d'isocytosine, est mise en évidence par les variations du spectre d'absorption en fonction de la nature du solvant (fig. V-3-*a*). Le spectre d'absorption de l'isocytidine ne subit pas de telles variations. Il ne présente que deux bandes dont les maximums sont, dans l'eau, à 258 et 207 mμ avec $\frac{\varepsilon_{207}}{\varepsilon_{258}} = 4{,}5$. L'absorption est négligeable, aussi bien dans l'éthanol que dans l'eau, au-dessus de 290 mμ.

Le spectre d'absorption de l'isocytosine dans l'eau peut être décomposé en deux spectres correspondant aux deux formes tautomères A et B (fig. V-3-*b*). Cette décomposition donne pour les deux formes les caractéristiques spectrales suivantes (78) :

	$\lambda_{max.}$ (mμ)	$\varepsilon_{max.}\ 10^{-3}$
A	255	5,6
	203	31
B	286	8,7
	221	8,1

L'étude cristallographique de l'isocytosine aux rayons X a, par ailleurs, montré que les deux tautomères co-cristallisent pour former un complexe 1 : 1. (79) Les structures déterminées pour les deux formes tautomères A et B sont les suivantes :



(A) (B)

Les proportions des deux tautomères en solution aqueuse, déterminées d'après la décomposition spectrale de la fig. V-3-*b*, sont respectivement 48 % pour A et 52 % pour B.

L'équilibre entre les deux formes tautomères de l'isocytosine en solution aqueuse (A ⇄ B) est déplacé de A vers B par élévation de température. Ce déplacement peut être suivi par spectrométrie différentielle (fig. V-4-*a*). La variation de la constante d'équilibre $K = \frac{[B]}{[A]}$ avec la température (fig. V-4-*b*) permet de calculer l'enthalpie de la réaction : $\Delta H = 1$ kcal/mole. La forme A est la plus stable en solution aqueuse. Par contre en solution alcoolique, l'élévation de température déplace l'équilibre de B vers A (80). La modification de la solvatation des molécules d'isocytosine peut donc entraîner une inversion de stabilité.

Source : MNHN, Paris

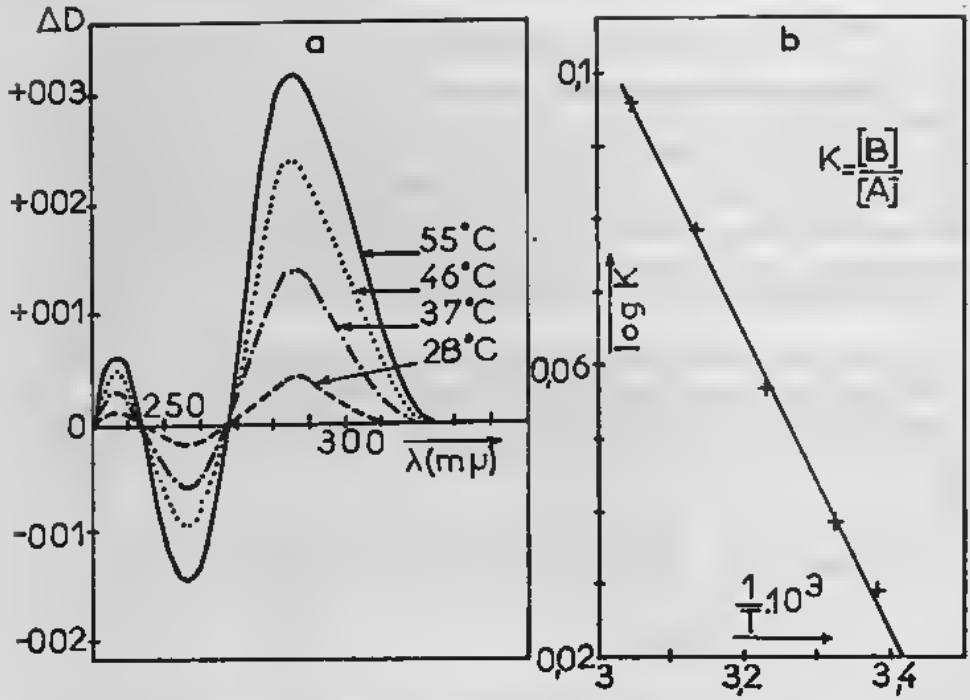


Fig. V-4 *a*. — Variation du spectre d'absorption de l'isocytosine dans l'eau en fonction de la température.

Fig. V-4 *b*. — Variation de la constante d'équilibre.

b) *Photoproduit métastable de l'isocytosine.*

En solution dans l'EPA (éther-isopentane-éthanol 5-5-2 v/v), l'isocytosine B est la forme nettement prédominante à 20° C. Si l'on abaisse la température, l'équilibre se déplace dans le sens B → A et en milieu rigide à 77° K une assez grande proportion de A est présente (fig. V-5). L'irradiation à 77° K entraîne les modifications spectrales reportées sur la figure V-5. Cette irradiation étant effectuée à des longueurs d'onde supérieures à 270 mμ grâce à un filtre placé entre la source et l'échantillon, seule la forme B de l'isocytosine est excitée. A une diminution de l'absorption, maximum vers 290 mμ, correspond une augmentation de la densité optique, maximum vers 250 mμ, avec un point isobestique assez bien défini à environ 272 mμ. Si la solution irradiée à 77° K est réchauffée jusqu'à obtenir un milieu fluide (à environ 100° K), puis refroidie à nouveau à 77° K, le spectre d'absorption revient pratiquement au spectre initial (avant irradiation). La réaction photochimique observée à 77° K est donc réversible en milieu fluide. Si la solution est irradiée, à 77° K, jusqu'à obtenir une diminution d'environ 15 % de la densité optique à 290 mμ puis réchauffée jusqu'à 20° C, son spectre d'absorption ne diffère du spectre initial à 20° C (avant refroidissement et irradiation) que de 4 % au maximum.

D'autre part, à 77° K dans l'EPA, le rendement de fluorescence ($\lambda_{max.} = 345$ mμ) est très élevé, la phosphorescence n'ayant qu'une très faible intensité. Le spectre d'excitation ($\lambda_{max.} = 300$ mμ) montre que cette fluorescence est due essentiellement à la forme B.

Source : MNHN, Paris

En conclusion, les molécules d'isocytosine B, excitées à 77° K dans l'EPA, par des radiations de longueurs d'onde supérieures à 270 mμ, peuvent :

1) revenir à l'état fondamental avec émission de fluorescence (rendement important);
2) subir une (ou plusieurs) réaction photochimique secondaire et irréversible qui se manifeste par la diminution de la densité optique (4 %) observée après réchauffement à 20° C.
3) enfin, et c'est le fait essentiel, donner lieu à la formation d'un photoproduit métastable, stabilisé par le milieu rigide, mais se retransformant en isocytosine B dès que le milieu devient fluide.

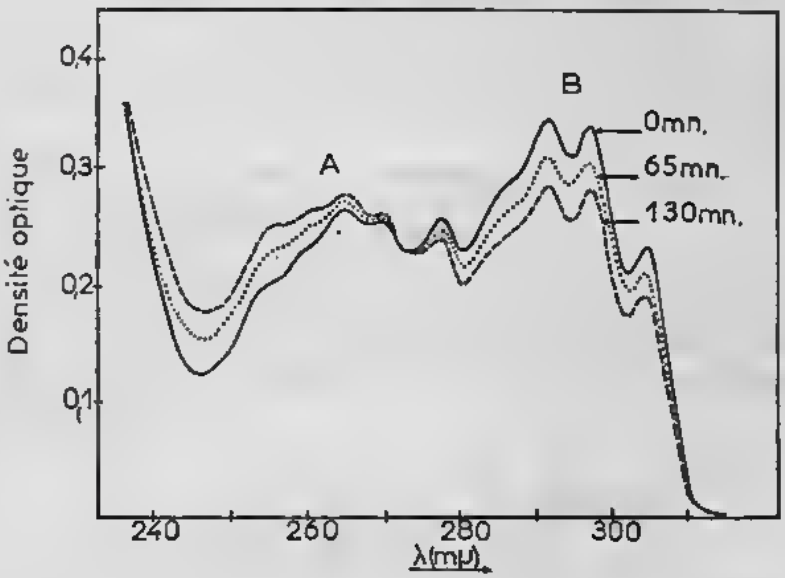


FIG. V-5. — Irradiation de l'isocytosine 10^{-4} M dans l'E. P. A. à 77° K.

Les variations spectrales réversibles enregistrées sur la figure V-5 sont analogues à celles dues au déplacement de l'équilibre entre les deux formes tautomères A et B par variation, soit de la température, soit de la nature du solvant. Le photoproduit métastable formé en milieu rigide à 77° K peut donc être le tautomère A.

Cependant les deux formes A et B donnent, en milieu acide, un même cation, ayant une structure résonnante, dont le maximum de la première bande d'absorption est 257 mμ, c'est-à-dire très voisin de celui de l'isocytosine A (255 mμ). Il n'est donc pas impossible, a priori, que le photoproduit réversible formé par irradiation à 77° K soit le cation obtenu par fixation d'un ion H^+ sur une molécule d'isocytosine B.

Dans l'une ou l'autre de ces hypothèses, le résultat essentiel est qu'il est possible d'induire, par les radiations ultraviolettes, la formation de composés métastables (tautomères ou formes ionisées) qui peuvent jouer un grand rôle, bien qu'inobservables dans les conditions usuelles, dans des processus tels que les mutations.

Source : MNHN, Paris

B. — INFLUENCE DES RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES SUR LES INTERACTIONS DANS LES DINUCLÉOTIDES

A la température ordinaire (20° C), les bases puriques sont beaucoup plus résistantes à l'égard des radiations ultraviolettes que les bases pyrimidiques. En conséquence, l'irradiation d'un dinucléoside phosphate tel que A_3p_5U, G_3p_5C ou C_3p_5A produit la transformation photochimique de la seule base pyrimidique (hydratation de la double liaison 5-6 de U ou C). Cette transformation photochimique entraîne la disparition plus ou moins totale de l'hypochromicité. Dans le cas du trinucléotide GpUpAp, l'hydratation de U a la même conséquence, alors que dans GpApUp, il reste une certaine hypochromicité, après l'hydratation photochimique de U, due aux interactions entre G et A.

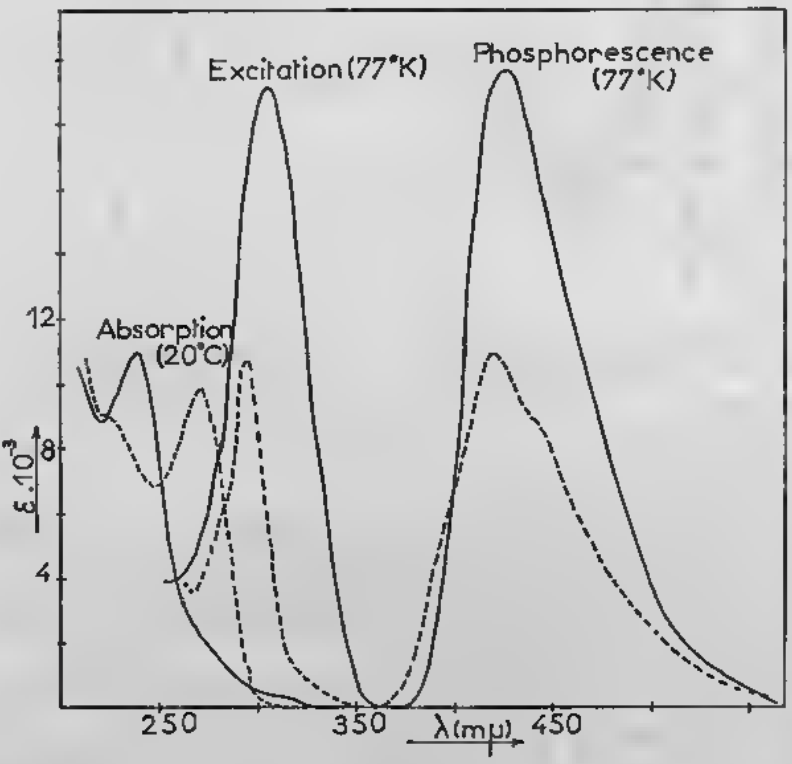


FIG. V-6. — Caractéristiques optiques de la cytidine (– – –) et de son photoproduit (——) dans H_2O.

Nous avons donc essayé de voir si la disparition de l'hypochromicité traduisait l'absence d'interactions dans les dinucléotides mixtes (purique-pyrimidique) après transformation photochimique de la base pyrimidique.

Source . MNHN, Paris

Le photoproduit de la cytidine donne une émission de phosphorescence plus intense que celle de la cytidine elle-même. Le spectre de phosphorescence est déplacé vers les grandes longueurs d'onde; donc l'énergie de l'état triplet phosphorescent est plus faible pour le photoproduit que pour la cytidine. L'excitation de cette phosphorescence se fait dans la faible bande d'absorption du photoproduit vers 300 mμ (sans doute par une transition $n \rightarrow \pi^*$) (Fig. V-6). Désignons par C*, le photoproduit de C. Si on irradie le dinucléotide $C_3{\cdot}p_5{\cdot}A$ en solution aqueuse à 20° C, on observe les variations spectrales relatives à l'hydratation photochimique en 5-6 de C. Les mesures de phosphorescence effectuées ensuite à 77° K montrent que la phosphorescence de l'adénosine dans le dinucléotide irradié diminue au fur et à mesure de l'irradiation. Donc le transfert de l'énergie d'excitation de A se fait beaucoup mieux dans $C^*{}_3{\cdot}p_5{\cdot}A$ que dans $C_3{\cdot}p_5{\cdot}A$. Il existe donc toujours une interaction importante entre C*et A qui ne se manifeste pas par de l'hypochromicité mais par un transfert d'énergie de A vers C*.

Le photoproduit C* de la cytidine est réversible : lorsque l'on laisse $C^*{}_3{\cdot}p_5{\cdot}A$ à 20° C pendant vingt-quatre heures, on revient pratiquement totalement au produit initial $C_3{\cdot}p_5{\cdot}A$. La phospborescence de A revient également à sa valeur initiale. Donc la disparition de la phosphorescence de A par irradiation de $C_3{\cdot}p_5{\cdot}A$ n'est pas due à une photolyse de A mais à un transfert plus efficace de A vers C*.

Or le rendement quantique de la réaction photochimique de C dans ApC ($8{,}5 \cdot 10^{-3}$) (hydratation de la double liaison 5-6) est plus faible que pour C seule ($13{,}5 \cdot 10^{-3}$) (81). Il est donc possible que, au cours de l'irradiation de ApC, le transfert de l'énergie d'excitation de A vers C* entraîne la réaction inverse de désbydratation ($C^* \rightarrow C$) ce qui expliquerait ce rendement plus faible.

C. — INFLUENCE DES INTERACTIONS SUR LES RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES

L'énergie d'excitation optique d'une base peut être transférée sur une base voisine (Chap. IV). Cette dernière a alors la possibilité de donner une réaction photochimique dépendant du niveau excité atteint par le transfert. Nous avons envisagé des absorptions biphotoniques pour expliquer la photoéjection d'électrons. L'état excité supérieur atteint au cours de telles absorptions bipbotoniques peut sans doute transférer son énergie à une autre molécule avec laquelle il a des interactions. Enfin les interactions par liaisons hydrogène doivent permettre l'apparition de propriétés photochimiques nouvelles. Nous avons donc essayé de mettre en évidence et d'étudier certaines de ces possibilités.

1° Influence du transfert triplet-triplet aur la photochimie des composants des acidee nucléiquea.

Dans les deux réactions essentielles des nucléosides pyrimidiques (hydratation et dimérisation), seule la dimérisation semble se faire à partir de l'état triplet (83). L'influence de l'oxygène et des ions de métaux de

Source : MNHN, Paris

transition, paramagnétiques, sur la dimérisation de l'uracile, de la thymine ou de l'acide orotique est la seule preuve expérimentale mettant en évidence le rôle de l'état triplet (82). L'étude du transfert d'énergie dans les dinucléotides (Chapitre IV) montre que l'uracile ou la thymine, qui possèdent un niveau triplet plus bas en énergie que celui des autres bases, recueillent une grande partie de l'énergie d'excitation de ces autres bases.

L'acide orotique ($\lambda_{max.} = 280$ mμ) possède un état triplet aisément détectable par phosphorescence ($\lambda_{max.} = 470$ mμ; $\tau = 0{,}2$ s) et par R. P. E. ($H_{min.} = 1\,232$ gauss). Cet état triplet peut être peuplé par transfert à partir de l'état triplet de la benzophénone sélectivement excitée vers 350 mμ (84). Dans l'éthanol à 20° C, l'irradiation de l'acide orotique n'entraîne pas de dimérisation mais probablement une décarboxylation, le maximum d'absorption passant de 280 mμ à 260 mμ (ce dernier étant le maximum d'absorption de l'uracile). Cependant l'irradiation de l'acide orotique dans l'éther donne lieu à la disparition de la bande d'absorption à 280 mμ comme lors de la dimérisation. La benzophénone excitée vers 350 mμ dans l'éther ne donne pratiquement pas de réaction photochimique aux doses de radiations utilisées. Cependant l'irradiation d'un mélange de benzophénone et d'acide orotique, excité vers 330 mμ où l'acide orotique n'absorbe plus, entraîne une décroissance de l'absorption de l'acide orotique (la réaction est suivie en différentielle, la cellule de référence contenant la solution de benzophénone et la cellule échantillon le mélange benzophénone plus acide orotique). Il n'est pas possible d'affirmer, d'après ces seules expériences, que la réaction photochimique ainsi engendrée est une dimérisation. Cependant ces expériences montrent que l'on peut provoquer cette réaction photochimique par transfert triplet-triplet sans exciter directement la molécule transformée photochimiquement. Des résultats analogues ont été obtenus avec la 5-bromocytosine qui, en solution dans l'éthanol et soumise à l'action de radiations ultraviolettes, subit une débromation conduisant à la cytosine. La 5-bromocytosine possède un état triplet relativement bas en énergie ($\lambda_{max.} = 450$ mμ) qui peut être atteint par transfert dans un dinucléotide tel que ApBrC (Chapitre IV). L'irradiation sélective de la benzophénone (vers 330 mμ) dans un mélange benzophénone plus 5-bromocytosine entraîne des modifications du spectre d'absorption montrant que la 5-bromocytosine subit une réaction photochimique analogue à celle qui se produit lorsqu'elle est directement irradiée. Cette réaction photochimique doit donc se produire au niveau de l'état triplet. On sait que l'incorporation d'un analogue tel que le 5-bromo-uracile ou la 5-bromocytosine dans les acides nucléiques entraîne une augmentation de leur sensibilité aux radiations ultraviolettes (96). Cette sensibilité accrue peut être liée à l'augmentation de la population de l'état triplet par rapport à la base non substituée, si la réaction photochimique a pour intermédiaire cet état triplet.

2° Photosensibilisation par transfert d'énergie à partir d'un état excité supérieur atteint par absorption biphotonique.

a) *Formation de radicaux par irradiation ultraviolette de dérivés puriques.*

Quand une solution aqueuse de purine, adénosine ou guanosine, congelée à 77° K, est irradiée à des longueurs d'onde supérieures à 250 mμ,

Source : MNHN, Paris

la photoéjection d'électrons donne naissance à un signal R. P. E. singulet à $g \simeq 2$. L'intensité de ce signal peut être diminuée par irradiation visible ($\lambda > 450$ mμ) (paragraphe V-A-2) (fig. V-7).

Si la solution aqueuse contient, en plus du soluté précédent (purine, adénosine ou guanosine), 2 % d'éthanol (0,35 M), l'irradiation a pour conséquence l'apparition d'un signal R. P. E. composé du signal caractéristique du radical $CH_3\dot{C}HOH$ (85) auquel se superpose un signal singulet

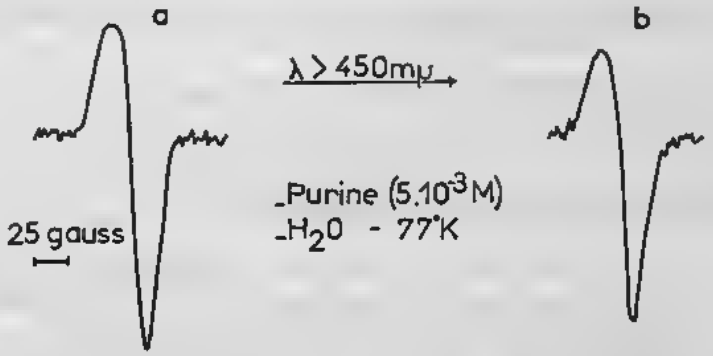


FIG. V-7.

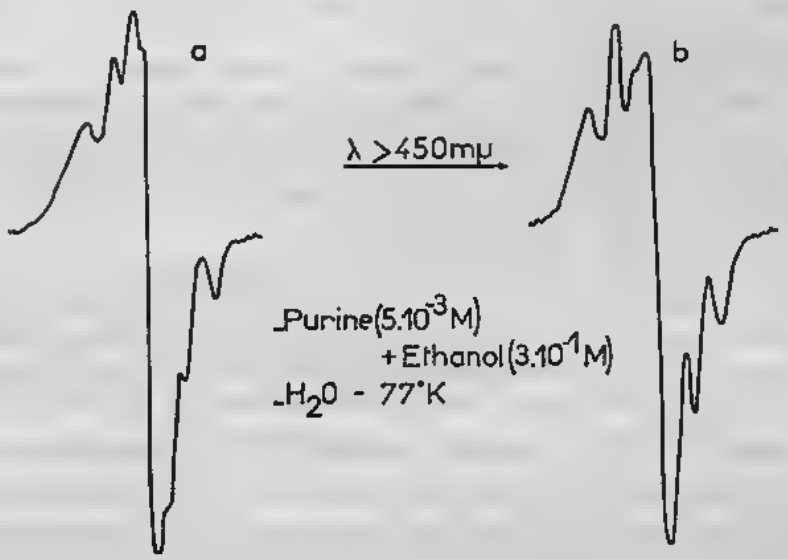


FIG. V-8. — Résonance des radicaux obtenus après irradiation à 77° K.

(fig. V-8-*a*). Si on irradie ensuite avec de la lumière visible ($\lambda > 450$ mμ), le signal singulet décroît et celui du radical $CH_3\dot{C}HOH$ se résout beaucoup mieux (fig. V-8-*b*) : la vitesse d'apparition du signal global au cours de l'irradiation ultraviolette est beaucoup plus grande en présence de 2% d'éthanol que dans l'eau pure : environ trente fois dans le cas de la purine, environ trois fois dans le cas de l'adénosine.

Source : MNHN, Paris

Si la concentration en éthanol dans le mélange est accrue, le signal singulet superposé au signal du radical de l'éthanol devient de moins en moins important. Au-delà de 20 % d'éthanol, ce singulet n'apparaît plus par irradiation et seul le signal du radical $CH_3\dot{C}HOH$ est enregistré. La lumière visible n'a alors plus d'action.

Les composés non phosphorescents étudiés (xanthosine, cytidine, thymine) ne donnent lieu à aucun des phénomènes précédemment décrits.

Deux phénomènes se produisent donc dans les solutions contenant moins de 20 % d'éthanol :

1) Une photoéjection d'électrons, comme dans l'eau pure,

$$Pu \longrightarrow Pu^+ + e^-$$

2) une photosensibilisation de l'éthanol.

Ces deux processus semblent compétitifs, l'augmentation de la concentration en éthanol favorisant le second qui devient le seul détectable si cette concentration dépasse 20 % (et dans l'éthanol pur).

Les électrons éjectés par irradiation ultraviolette sont piégés dans le réseau cristallin mais sont éjectés de leurs piéges par la lumière visible. Ils peuvent alors être captés par les ions Pu^+, par les molécules du solvant ou même par des molécules neutres du soluté initial (Pu) qui ont une trés grande affinité pour les électrons (94).

Par rapport à une solution aqueuse, l'accroissement du rendement de la photoéjection quand on ajoute de l'éthanol est lié à l'augmentation de la population de l'état triplet du soluté. On a vu en effet, au chapitre III (paragraphe C-2-*b*), que l'addition de faibles quantités d'éthanol à une solution aqueuse accroît considérablement le rendement de phosphorescence (environ 20 fois pour la purine, 3 fois pour l'adénosine). Ceci confirme le rôle de l'état triplet dans ce phénomène.

En dehors des signaux de R. P. E., l'apparition des radicaux de l'éthanol entraîne une extinction de la phosphorescence des solutions alcooliques irradiées. La décroissance de l'intensité de phosphorescence, en fonction du temps d'irradiation, suit une loi pratiquement exponentielle tant qu'on ne dépasse pas un temps $\mathcal{C}$ d'irradiation tel que cette intensité soit divisée par deux. La constante de vitesse $\left(k = \frac{0{,}69}{\mathcal{C}}\right)$ de cette extinction de phosphorescence dépend de l'intensité I de la lumière incidente et varie comme I^p avec $p \simeq 1{,}6$. Si on irradie une solution pendant un temps $\mathcal{C}$ à 77° K, que l'on réchauffe jusqu'à 20° C et que l'on refroidisse à nouveau à 77° K, 90 % environ de l'intensité initiale de phospborescence est restaurée. Il faut évidemment prendre soin dans cette expérience d'irradier uniformément tout le volume de l'échantillon pour éviter le mélange, au cours du réchauffement, entre les parties irradiées et les parties non irradiées. Le spectre d'absorption à 77° K dans l'EPA ne varie pratiquement pas sous l'effet de doses de radiations ultraviolettes suffisantes pour provoquer une forte diminution de l'intensité de phosphorescence. Si l'irradiation est poussée plus loin, on observe l'apparition d'une bande d'absorption entre 300 et 350 mμ particulièrement dans le cas de la purine. Aucune

Source : MNHN, Paris

bande d'absorption n'apparaît dans le visible. La restauration de la phosphorescence par chauffage et les mesures d'absorption montrent donc que les molécules du soluté ne sont pas détruites par irradiation ultraviolette de solutions alcooliques. Il y a seulement eu transfert de l'énergie des molécules de purine, d'adénosine ou de guanosine, optiquement excitées, sur les molécules d'éthanol qui se sont photolysées avec production de radicaux libres.

b) *Relation entre la population de l'état triplet, l'intensité de la lumière et la formation de radicaux dans les solutions alcooliques* à 77° K.

En solution alcoolique à 77° K, l'état triplet le plus bas de la purine, l'adénosine ou la guanosine peut être peuplé suffisamment pour enregistrer son spectre R. P. E. (Chapitre III). La concentration en radicaux produits par l'irradiation, mesurée par l'intensité de leur signal R. P. E., varie linéairement avec le temps d'irradiation pour une intensité d'irradiation I assez

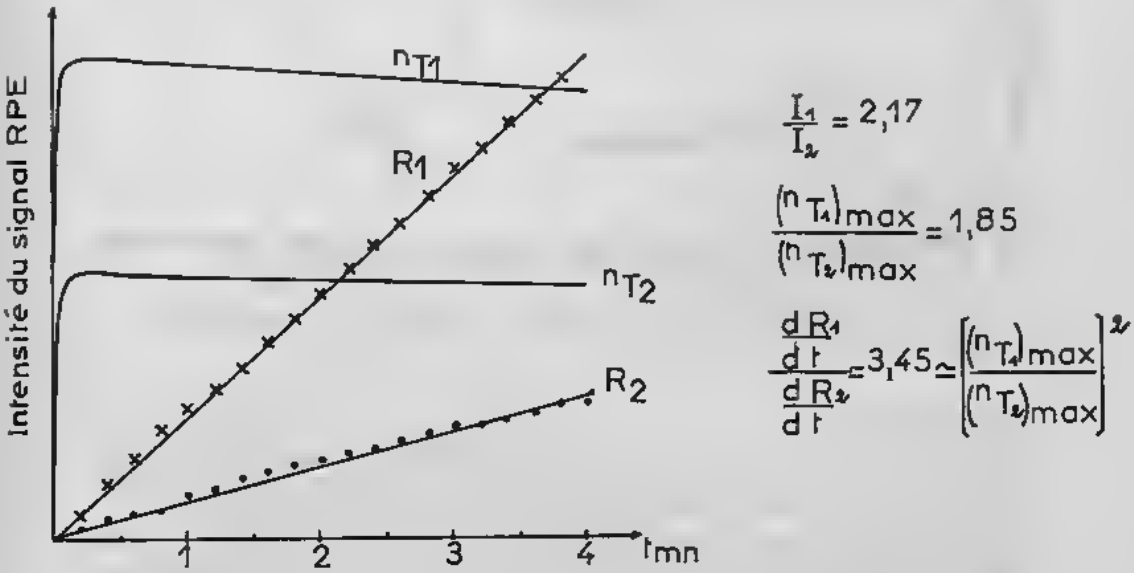


FIG. V-9. — Photosensibilisation de l'éthanol par la purine à 77° K.

faible (fig. V-9). Sous irradiation continue, l'intensité du signal R. P. E. de l'état triplet décroît très lentement après avoir atteint son maximum (fig. V-9). L'intensité maximum de ce signal est proportionnelle à l'intensité $I_{eff.}$ de la lumière réellement absorbée par les molécules de soluté. La vitesse d'apparition des radicaux est proportionnelle à $(I_{eff})^2$ alors qu'elle n'est proportionnelle qu'à I^p avec $p \simeq 1,6$. Il y a donc, même à ces intensités d'irradiation relativement faibles, une dépopulation appréciable de l'état fondamental des molécules de soluté. Avec des intensités d'irradiation multipliées par un facteur 20 environ, la concentration en molécules dans l'état triplet (n_t) et en radicaux (R), mesurée par l'intensité de leurs signaux R. P. E. respectifs, varie en fonction du temps d'irradiation comme

Source : MNHN, Paris

le montrent les courbes de la figure V-10-*a*. A un instant t quelconque, la vitesse de formation des radicaux est proportionnelle à la concentration en molécules dans l'état triplet (fig. V-10-*b*).

$$\frac{dR}{dT} = k \cdot n_T.$$

Des expériences réalisées sur des échantillons dégazés montrent que l'oxygène dissous n'a pas d'effet sur les mesures cinétiques aussi bien de R. P. E. que de phosphorescence. L'ensemble de ces résultats prouve que

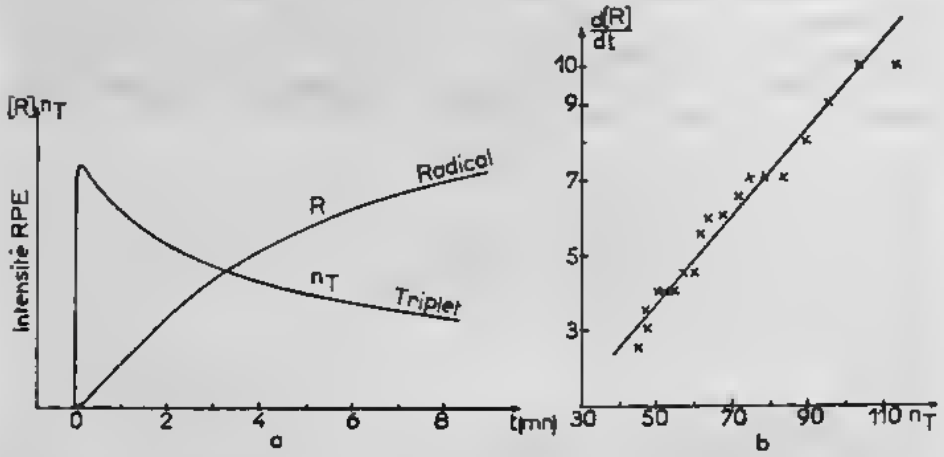


Fig. V-10. — Cinétique de photosensibilisation de l'éthanol par la purine à 77° K.

la photosensibilisation de l'éthanol se fait à la suite de l'absorption consécutive de deux photons et que l'espèce intermédiaire métastable, absorbant le second photon, est probablement une molécule de soluté portée dans son état triplet à la suite de l'absorption du premier photon (fig. V-11).

La réaction photochimique étant consécutive à l'absorption d'un photon par une molécule dans son état triplet, la vitesse de formation des radicaux $\frac{dR}{dt}$, à un instant t après le début de l'irradiation, est donnée par

$$\frac{dR}{dt} = K \cdot I_a \cdot n_T (t)$$

où K représente une constante de vitesse globale pour l'absorption et le transfert d'énergie sur le solvant, I_a est l'intensité de la radiation absorbée par les molécules du soluté dans l'état triplet et n_T (t) la concentration en molécules du soluté à l'état triplet à l'instant t (l'instant $t = 0$ correspond au début de l'irradiation et l'instant $t = \theta$ correspond au temps au bout duquel n_T a atteint son maximum). Quand t tend vers θ, $\frac{dR}{dt}$ tend vers $K \cdot I_a \cdot n_T$ (θ). Or n_T (θ) est proportionnelle à l'intensité I_a de la radiation

Source : MNHN, Paris

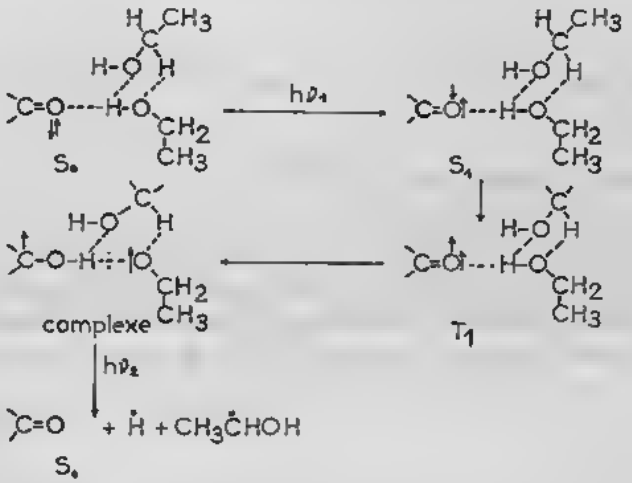
absorbée par les molécules du soluté dans l'état fondamental (voir Chapitre III) : $n_T(\theta) = K'I_1$. Donc $\left(\frac{dR}{dt}\right)_{t=\theta} = K \cdot K' \cdot I_1 \cdot I_2$.

Dans les conditions utilisées, on peut admettre que les molécules du soluté dans l'état triplet absorbent les mêmes radiations que dans l'état fondamental, c'est-à-dire que $I_1 = I_2 = I_{eff}$.

D'où $\left(\frac{dR}{dt}\right)_{t=\theta} = K \cdot K' \cdot I_{eff}^2$.

On retrouve donc ainsi la dépendance en I_{eff}^2 trouvée expérimentalement.

Dans le cas de molécules possédant un état triplet n—π^* fortement localisé, comme triplet le plus bas, un complexe a été suggéré comme intermédiaire dans les réactions biphotoniques. Ce complexe serait le résultat d'un transfert d'atome H d'une molécule de solvant à la molécule du soluté dans son état triplet suivant le schéma ci-dessous (88) (pour un composé possédant un groupement carbonyle responsable de la formation de l'état triplet) :



Le même schéma peut être fait en remplaçant $> C = O$ par $\gg N$:

Cependant, les mesures de R. P. E. et de phosphorescence montrent que l'état triplet de la purine, l'adénosine ou la guanosine est un état π—π^* et non n—π^*. Son temps de vie est suffisant pour permettre à l'absorption du deuxième photon d'avoir lieu avec une bonne probabilité.

Cependant on ne peut pas rejeter a priori la formation d'un complexe soluté-solvant intermédiaire, formé à partir de l'état triplet du soluté, même dans le cas d'un triplet π—π^* (87).

Les études de photosensibilisation de l'éthanol dans des solutions aqueuses contenant des quantités croissantes d'éthanol montrent que pour une concentration 10^{-3}M du soluté, il faut environ cent fois plus de molécules d'éthanol pour que la photosensibilisation ait lieu avec un rendement maximum. La photosensibilisation pourrait donc se faire à la suite d'un transfert entre états triplets, un état triplet supérieur du soluté et l'état triplet le plus bas du solvant, suivant le schéma de la figure V-11 (89).

Source : MNHN, Paris

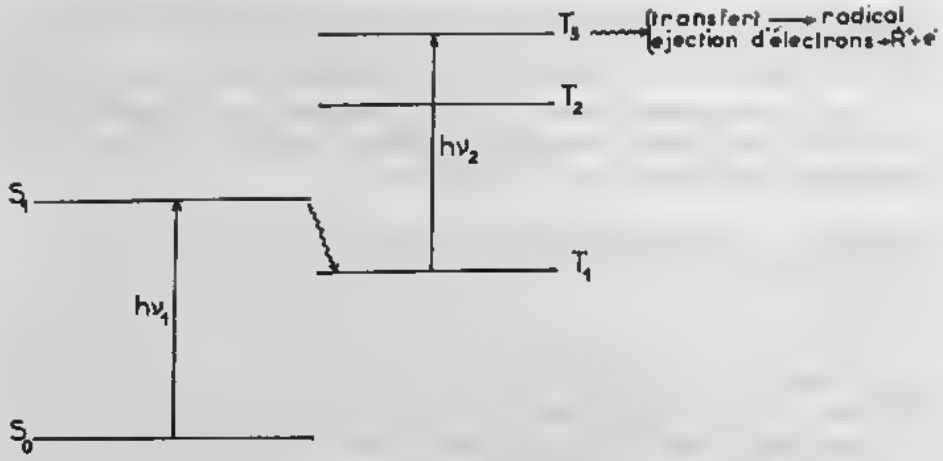


FIG. V-11. — Schéma des mécanismes de photo-éjection d'électrons et de photosensibilisation du solvant.

c) *Photosensibilisation d'un acide aminé aliphatique par les nucléosides puriques.*

L'acide aminé aliphatique choisi est la glycine $\left(CH_2\begin{matrix}NH_2\\COOH\end{matrix}\right)$ qui peut donner naissance, par irradiation ultraviolette à des longueurs d'onde inférieures à 220 mμ ou par action de radiations ionisantes, à un radical (CH_2-COO^-) dont le signal R. P. E. est composé de trois raies, donc facilement identifiable. L'irradiation d'une solution aqueuse de glycine (10^{-1}M), à des longueurs d'onde supérieures à 250 mμ, ne donne aucun signal

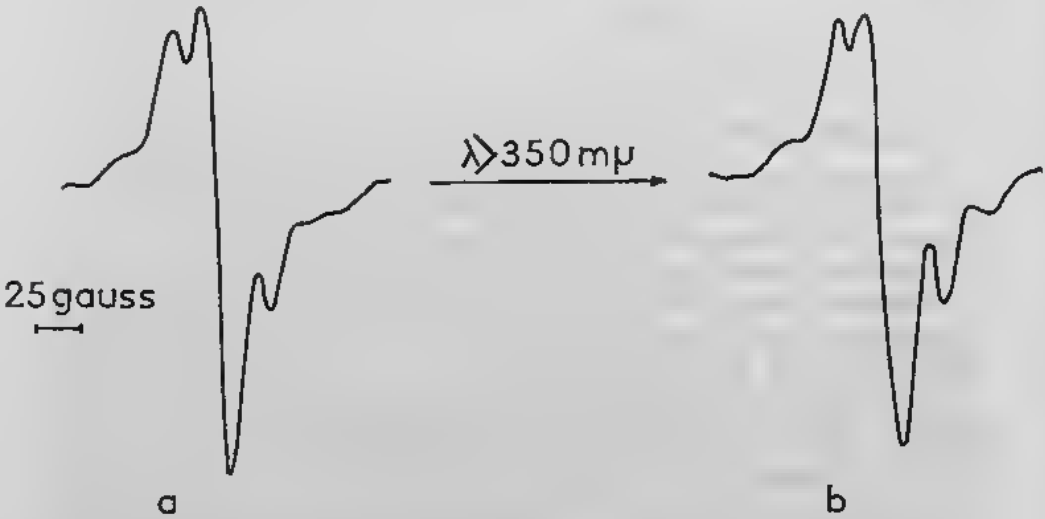


FIG. V-12. — Résonance des radicaux obtenus par photosensibilisation de la glycine (10^{-1} M) par l'adénosine (10^{-3} M) dans H_2O à 77° K.

Source : MNHN, Paris

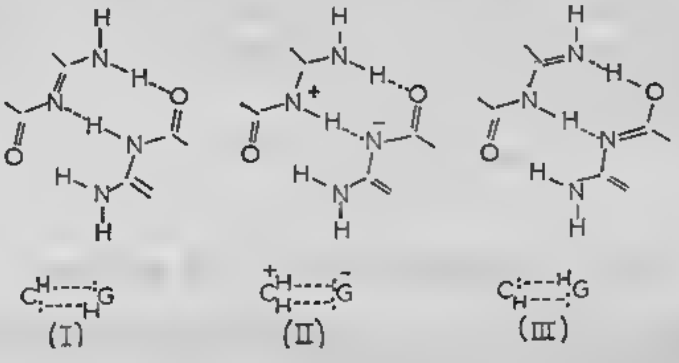
R. P. E. L'irradiation d'une solution aqueuse d'adénosine (10^{-3}M) et de glycine (10^{-1}M) à des longueurs d'onde supérieures à 250 mμ entraîne l'apparition du signal R. P. E. caractéristique du radical de la glycine, auquel se superpose un signal singulet (figure V-12-*a*). L'action ultérieure de lumière visible entraîne une légère diminution de l'intensité de ce signal singulet (figure V-12-*b*).

Ces résultats sont analogues à ceux enregistrés avec l'étbanol au lieu de la glycine (paragraphe V-C-2-*a*). Deux phénomènes ont lieu simultanément : une photoéjection d'électrons et surtout une pbotosensibilisation de la glycine par l'adénosine. La photosensibilisation de la glycine peut être également réalisée à l'aide d'un acide aminé aromatique (91). Le phénomène de pbotosensibilisation d'acides aminés aliphatiques par les nucléosides revêt sans nul doute un intérêt considérable dans la photochimie des acides nucléiques *in vivo*.

3° Transfert de proton entre les bases d'un même plateau.

Parmi les photoproduits métastables susceptibles de se former au cours de l'irradiation ultraviolette des constituants des acides nucléiques, nous avons envisagé des formes tautomères et des formes ionisées des bases (paragrapbe A-3). Cependant nous avons vu que la détection, par spectropbotométrie d'absorption, de ces formes sur les bases isolées, par irradiation en milieu rigide à 77° K, présentait d'énormes difficultés dues essentiellement au recouvrement des spectres d'absorption des différentes formes et à la faible probabilité des réactions envisagées. Le seul cas favorable, l'isocytosine, n'a pas permis de trancher définitivement entre la formation, par irradiation, d'une forme tautomère ou d'une forme ionisée. Cependant, lorsqu'une base a formé des liaisons hydrogène avec son partenaire dans une double hélice, la probabilité d'une double tautomérisation ou d'une double ionisation n'est sans doute plus négligeable.

Considérons par exemple une paire de bases telle que guanine-cytosine (I).

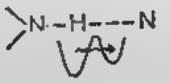


(I) (II) (III)

On peut envisager le transfert d'un atome H impliqué dans une liaison hydrogène de l'une des bases vers l'autre base, donnant ainsi naissance à l'anion de la première et au cation de la seconde (II) (double ionisation). On peut aussi envisager le transfert, simultané ou consécutif, de deux atomes H, en sens contraires, donnant naissance à deux formes tautomères

Source : MNHN, Paris

des deux bases initiales (III, double tautomérisation). Cette dernière possibilité a été envisagée de façon théorique par LÖWDIN. Le double transfert de proton pourrait être réalisé spontanément par effet tunnel au travers de la barrière de potentiel séparant les deux positions d'équilibre de chaque atome H (schéma ci-dessous) impliqué dans une liaison hydrogène :



La probabilité de ce phénomène est évidemment très faible mais suffirait, suivant les calculs de LÖWDIN (92), pour expliquer les mutations spontanées. En effet au cours de la replication du DNA, les deux bases, sous leur forme tautomère (C* et G*), s'apparieraient respectivement avec A et T (au lieu de G et C). A la replication suivante, on aurait alors deux paires A-T à la place de deux paires G-G. Tout le raisonnement précédent peut évidemment s'appliquer à une paire A-T au lieu de G-C. Le schéma proposé par LÖWDIN pourrait s'appliquer à une double tautomérisation non plus spontanée mais induite par les rayonnements (ionisants ou ultraviolets). Aucune expérience ne permet actuellement de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Par contre, comme nous allons le voir, le transfert photochimique d'un seul proton, avec formation de deux formes ionisées, semble confirmé par l'expérience. Une prévision théorique de la probabilité de ce transfert, suivant la paire de bases impliquée, peut être avancée.

a) *Comparaison théorique des probabilités de photoionisation des deux paires de bases.*

Connaissant le pK d'un nucléoside dans l'état fondamental et les énergies ΔE et $\Delta E'$ des transitions singulet-singulet excité de la forme neutre et de la forme ionisée, il est possible de calculer le pK* de l'état singulet excité correspondant. En effet soit M une molécule électriquement neutre et MH^+ le cation correspondant. Désignons par ΔH l'enthalpie de la réaction $MH^+ \rightleftarrows M + H^+$ où les molécules sont dans leur état fondamental et par ΔH^* l'enthalpie de la même réaction, les molécules étant dans leur premier état singulet excité. Il est facile de voir d'après le schéma de la figure V-13, que l'on a la relation :

$$\Delta E + \Delta H = \Delta H^* + \Delta E'$$

soit
$$\Delta H - \Delta H^* = \Delta E' - \Delta E$$

Or
$$\Delta H - \Delta H^* = (\Delta F + T \cdot \Delta S) - (\Delta F^* + T \cdot \Delta S^*).$$

Si l'on admet que les variations d'entropie sont pratiquement identiques dans les deux états ($\Delta S \simeq \Delta S^*$), on obtient

$$\Delta E' - \Delta E \simeq \Delta F - \Delta F^* = -RT\,(\mathrm{Log}\,K - \mathrm{Log}\,K^*)$$

Soit
$$pK - pK^* = \frac{\Delta E' - \Delta E}{2{,}303\,RT}$$

Source . MNHN, Paris

Pour un équilibre du type $MH \rightleftarrows M^- + H^+$, où MH représente une molécule neutre et M^- l'anion correspondant, la relation de départ est $\Delta E + \Delta H^* = \Delta E' + \Delta H$ (fig. V-13). Le calcul conduit alors à la relation

$$pK - pK^* = \frac{\Delta E - \Delta E'}{2{,}303\ RT}$$

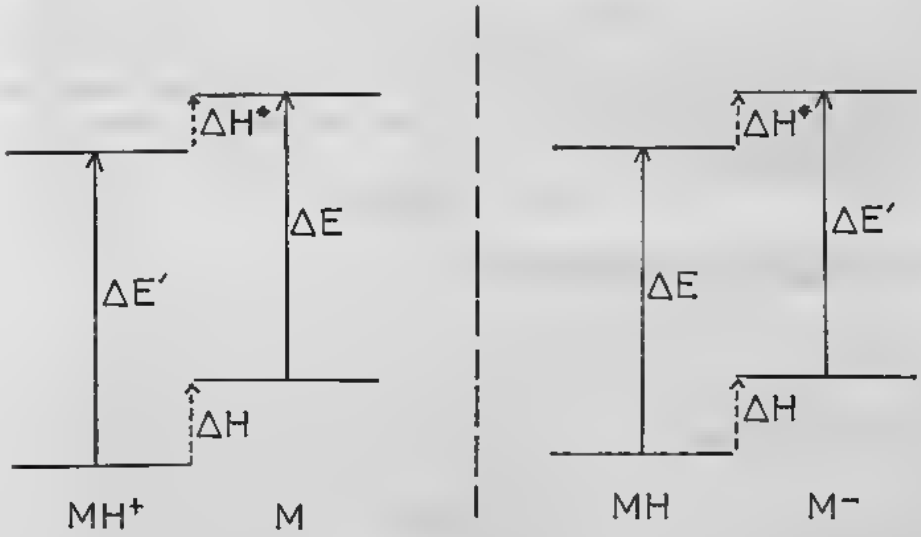


FIG. V-13.

Sur le tableau V-1 sont consignés les résultats concernant ΔE et $\Delta E'$ (obtenus au chapitre III), les pK (valeurs prises dans la littérature) et les pK* calculés par la formule ci-dessus.

TABLEAU V-1

pK* DU PREMIER ÉTAT SINGULET EXCITÉ DES NUCLÉOSIDES

		E (cal.)	E' (cal.)	$pK_{25°\,C}$	$pK^*_{25°\,C}$
Adénosine	A	101 600		3,55	4,06
	AH^+		100 000		
Uridine	UH	99 500		9,51	9,93
	U^-		100 000		
Cytidine	C	97 100		4,22	6,26
	CH^+		94 300		
Guanosine	GH	96 900		9,24	10,62
	G^-		98 800		

Source . MNHN, Paris

Considérons les complexes guanosine-cytidine et adénosine-uridine. Ils peuvent donner lieu aux équilibres d'ionisation suivants :

$$GH\text{-}C \rightleftharpoons G^- - HC^+ \quad (1)$$

$$A\text{-}HU \rightleftharpoons AH^+ - U^- \quad (2)$$

où GH, C, A, HU représentent les molécules neutres électriquement. Si l'on suppose, ce qui n'est évidemment qu'une grossière approximation, que les pK des nucléosides ne sont pas modifiés par la formation de liaisons hydrogène inter-moléculaires, la constante de ces équilibres peut être calculée à partir des pK de chaque nucléoside. En effet la constante K_1 de l'équilibre (1) s'écrit

$$K_1 = \frac{[G^-]\,[CH^+]}{[GH]\,[C]}$$

Les constantes K des deux équilibres

$$GH \rightleftharpoons G^- + H^+$$

$$CH^+ \rightleftharpoons C + H^+$$

sont respectivement

$$K_G = \frac{[G^-]\,[H^+]}{[GH]}$$

$$K_C = \frac{[C]\,[H^+]}{[CH^+]}$$

D'où

$$K_1 = \frac{K_G}{K_C} = 9{,}5 \cdot 10^{-6}$$

De même

$$K_2 = \frac{K_U}{K_A} = 1{,}1 \cdot 10^{-6}$$

La probabilité d'ionisation dans l'état fondamental, à l'intérieur d'une paire de nucléosides appariés, est donc relativement faible et du même ordre de grandeur pour les deux paires adénosine-uridine et guanosine-cytidine. Le même calcul peut être repris en utilisant les pK* des états excités précédemment calculés (table V-1) pour obtenir les constantes des équilibres (1) et (2) au cours d'une excitation optique. On trouve alors les valeurs respectives

$$K_1^* = \frac{K_G^*}{K_C^*} \simeq 4{,}3 \cdot 10^{-5}$$

$$K_2^* = \frac{K_U^*}{K_A^*} \simeq 1{,}3 \cdot 10^{-6}$$

On constate donc que, dans le premier état singulet excité, la probabilité d'ionisation des deux partenaires d'un même plateau est multipliée par un facteur 30 environ pour la paire guanosine-cytidine qui a la constante d'équilibre la plus grande.

Si le transfert de proton, au cours de l'excitation optique, se fait entre molécules dans leur état singulet excité, la probabilité d'ionisation guanosine-cytidine est beaucoup plus grande que pour la paire adénosine-uridine.

Source . MNHN, Paris

Ce calcul ne tient pas compte du fait important que la probabilité d'ionisation d'une molécule dépend des liaisons hydrogène que cette molécule a contracté avec, par exemple, un autre soluté ou le solvant; mais il permet néanmoins de comparer cette probabilité pour les deux paires.

La détermination des pK* correspondant aux états triplets des nucléosides est trés limitée par le fait qu'on ne peut avoir accès directement aux spectres d'absorption singulet-triplet. D'autre part la variation de la phosphorescence avec le pH ne permettrait une détermination assez précise de ces pK* que dans le cas où les phosphorescences des deux formes (neutre et ionisée) d'un même nucléoside seraient aisément détectables et séparables. Ceci n'est le cas que pour l'adénosine dont le pK correspondant à l'état triplet est apparemment le même que celui du premier état singulet excité. Il n'est donc pas possible de prévoir les probabilités de transfert de proton dans l'état triplet le plus bas.

b) *Mise en évidence, par spectrophotométrie d'émission, d'un transfert de proton à la suite de l'excitation optique de deux bases appariées.*

Dans certains cas privilégiés, les caractéristiques de l'état triplet de formes ionisées des bases permettent de les distinguer des formes neutres plus aisément que ne le permettent les spectres d'absorption. C'est le cas notamment pour G^+ et G, T^- et T, U^- et U, le spectre de phosphorescence et le temps de vie de l'état triplet phosphorescent ainsi que le signal R. P. E. de cet état triplet permettant de différencier la forme ionisée de la forme neutre électriquement (voir Chapitre III).

L'étude du transfert de proton a été faite sur des polynucléotides synthétiques poly *r* AU et poly *d* AT (*r* pour ribose, *d* pour désoxyribose). Ces deux polynucléotides, à séquence alternée, existent en solution aqueuse sous forme d'une double hélice. Les expériences de SHULMAN et ses collaborateurs (42) semblent prouver que l'état triplet que l'on détecte sur ces polynucléotides, aussi bien par phosphorescence que par résonance paramagnétique électronique, correspond à l'uracile ou à la thymine sous leur forme ionisée U^- ou T^-. C'est ainsi que le temps de vie de l'état triplet du poly *d* AT est 0,34 s comparé à 0,5 s pour T^- alors que G et A ont des temps de vie respectivement de 1,35 s et 2,6 s. De même, les valeurs de $H_{min.}$, pour une fréquence de 9 105 Mc/s, sont respectivement de 1 067 gauss pour T^- et 1 046 gauss pour poly *d* AT, alors que les résonances pour l'état triplet de G et A sont obtenues à des valeurs du champ nettement supérieures à 1 300 gauss. Les résultats obtenus par ces mêmes auteurs sur le DNA semblent confirmer que toute la phosphorescence du DNA est due à la thymine ionisée T^- (temps de vie 0,27 s; $H_{min.} = 1\,054$ gauss).

Selon les auteurs précédents, l'excitation dans le poly *d* AT se localiserait au niveau de la thymine qui, dans un état excité, transférerait un proton vers la base complémentaire A. Puisque de A^+ et T^-, ainsi obtenus par le transfert de proton, seul T^- phosphoresce, l'émission du poly *d* AT peut être identifiée à celle de T^-.

En solution aqueuse congelée à 77° K, les résultats obtenus sur les mélanges A + T sont analogues à ceux obtenus par SHULMAN et collaborateurs sur le poly *d* AT : la phosphorescence de l'adénosine ($\lambda_{max.} = 430$ mμ, $\mathcal{T} = 2{,}3$ s) disparaît tandis qu'apparaît une nouvelle phosphorescence : $\lambda_{max.} = 460$ mμ, $\mathcal{T} = 0{,}32$ s. Cette nouvelle phosphorescence est pratiquement identique à celle que l'on obtient pour la thymidine

Source : MNHN, Paris

en milieu basique (pH $\simeq$ 11). Cependant, si l'on remplace la thymidine par la 3-méthylthymidine, les mêmes phénomènes sont observés bien que la 3-méthylthymidine ne puisse perdre un proton. Il est donc probable que l'on est en présence d'un transfert d'énergie triplet-triplet plutôt que d'un transfert de proton (voir Chapitre IV). Si la thymidine est excitée dans son premier état singulet excité, la probabilité de conversion singulet-triplet est si faible qu'il est impossible de détecter l'état triplet par phospborescence. Par contre, si cet état triplet est directement atteint par transfert triplet-triplet, il devient observable. L'augmentation du rendement de phosphorescence en milieu basique est probablement dû à un effet d'environnement qui augmente la probabilité de transition singulet-triplet.

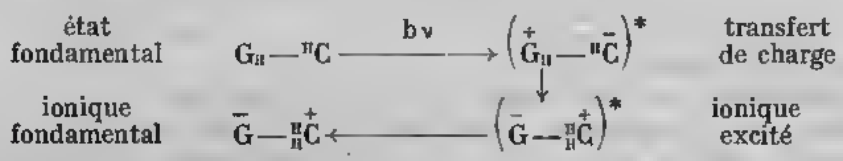
Ces expériences semblent donc montrer que le transfert de proton n'est pas nécessaire pour expliquer les résultats de SHULMAN et collaborateurs.

Dans le cas des paires G-C, l'étude des mélanges poly G + poly C montre que la phosphorescence du poly G subit une extinction lorsque le complexe poly G-poly C est formé (42). De même nous avons pu montrer que dans les mélanges AcC + G, en solution aqueuse congelée à 77°K, la phosphorescence de AcC est fortement diminuée même pour de faibles concentrations relatives en G (0,01). Il est probable que AcC et G forment un complexe par liaison hydrogène. Dans les agrégats obtenus en solution aqueuse congelée de AcC, l'énergie d'excitation est probablement délocalisée et la présence d'un seul complexe entre l'une des molécules de l'agrégat et une molécule de guanosine pourrait servir de piège à l'énergie d'excitation qui serait alors dissipée non radiativement.

c) *Transfert de proton et tautomérisation à la suite d'une photoéjection d'électrons.*

Une photoéjection d'électrons a lieu lorsque les nucléosides puriques phosphorescents sont soumis à une irradiation ultraviolette en solution aqueuse congelée (paragraphe V-A-2). Or il a été montré que les nucléosides aussi bien puriques que pyrimidiques sont très réactifs vis-à-vis des électrons. D'autre part, les calculs théoriques (93) ont montré que la probabilité de tautomérisation dans la paire G-C, par exemple, est beaucoup plus grande pour l'anion $(G\text{-}C)^-$: $K = 8 \cdot 10^2$, que pour le cation $(G\text{-}C)^+$: $K = 3{,}1 \cdot 10^{-2}$, l'état excité singulet ou triplet : $K = 2{,}3 \cdot 10^{-6}$ ou l'état fondamental $K = 2{,}4 \cdot 10^{-23}$. (K est le rapport entre la concentration en formes tautomères rares G*-C* et celle en formes normales G-C). Donc à la suite d'une éjection d'électron $(G\text{-}C)^+$ ou de la capture d'un électron par une paire de bases $(G\text{-}C)^-$, on peut envisager une tautomérisation.

Enfin un transfert d'électron de G vers C, par exemple, à l'intérieur de la paire G-C peut donner un état ionique excité qui se désactive ensuite vers un état ionique fondamental suivant le schéma (95) :



On voit ainsi les nombreuses conséquences que permet d'envisager l'influence des interactions sur une propriété photochimique comme la photoéjection d'électrons décrite pour certains constituants des acides nucléiques.

Source : MNHN, Paris

CONCLUSIONS — PERSPECTIVES

Conformément au plan et aux limites que nous nous étions assignés, nous avons étudié, de façon systématique, l'influence des interactions sur l'utilisation de l'énergie d'excitation optique par les constituants des acides nucléiques. Deux techniques principales ont été utilisées : la spectroscopie d'émission et la résonance paramagnétique électronique. Cette étude a permis d'obtenir des résultats originaux sur la structure électronique et les propriétés photochimiques de ces constituants, sur le transfert de l'énergie d'excitation optique dans les dinucléotides et les agrégats, et sur le rôle de ce transfert dans certaines réactions photochimiques des acides nucléiques. Nous pouvons les résumer ainsi :

1° **L'étude des états excités des nucléotides** et des transitions entre ces états et l'état fondamental a permis de préciser la nature de ces états et leur position relative ainsi que l'influence de l'environnement. Une absorption triplet-triplet a pu être mise en évidence, pour les nucléosides puriques, par ses conséquences photochimiques (photoéjection d'électrons et photosensibilisation de solvants).

2° **Le transfert de l'énergie d'excitation optique** entre bases superposées a été mis en évidence par l'étude de la luminescence des dinucléotides et des agrégats formés dans les solutions aqueuses congelées à 77° K.

a) Entre bases puriques, le transfert se fait de la guanine vers l'adénine. Les bases puriques peuvent transférer leur énergie aux bases pyrimidiques. Ce transfert est du type triplet-triplet.

b) Le transfert d'énergie triplet-triplet entre bases différentes, dans un dinucléotide ou dans un agrégat mixte, implique l'existence d'un recouvrement des nuages électroniques de ces bases. Les forces d'échange électronique s'ajoutent donc aux forces de Van der Waals-London pour assurer la stabilité de la structure hélicoïdale des polynucléotides et des acides nucléiques.

c) Lorsque deux bases superposées d'un dinucléotide sont identiques, le transfert d'énergie peut se faire par un mécanisme excitonique. L'application de la théorie de l'exciton à ces dinucléotides permet de déterminer l'orientation relative des deux bases. Cette orientation dépend de l'isomérie de la liaison phosphodiester. L'étude des transferts d'énergie constitue donc un moyen de préciser la structure secondaire des dinucléotides.

3° **Le transfert de l'énergie d'excitation optique**, qui résulte des interactions, conduit à une localisation de cette énergie en certains sites et à l'apparition de réactions photochimiques nouvelles :

a) Un transfert de proton entre les bases d'un même plateau (par exemple entre guanine et cytosine) peut avoir lieu sous l'action des radiations du proche ultraviolet, par l'intermédiaire des liaisons hydrogène.

Source : MNHN, Paris

b) La dimérisation de la thymine, qui semble se faire par l'intermédiaire de son état triplet, devient l'événement photochimique le plus probable dans l'ADN, à la suite du transfert. En effet l'énergie d'excitation optique se localise sur la thymine qui possède le niveau triplet le plus bas.

c) Les absorptions biphotoniques, suivies de transfert ou de photoéjection d'électrons, peuvent conduire à la localisation d'une énergie beaucoup plus importante que ne le laisse prévoir une absorption directe. L'espèce intermédiaire absorbant le deuxième photon est la molécule dans son état triplet. Nous avons pu mettre en évidence une photosensibilisation, par les nucléosides puriques, non seulement du solvant (par exemple l'éthanol), mais encore d'acides aminés aliphatiques (par exemple la glycine). Ces phénomènes nouveaux méritent, sans nul doute, une étude beaucoup plus approfondie. Ce sont des éventualités qu'on ne peut négliger en photobiologie, étant donné les intensités d'irradiation utilisées.

4° **Les tentatives de photo-tautomérisation** des bases et nucléosides nous ont conduit à mettre en évidence l'existence, avant toute irradiation, de formes tautomères de certains de ces composés en solution (cytosine, cytidine, isocytosine, uracile). Un rôle essentiel a été attribué à ces formes tautomères dans les phénomènes de replication de l'ADN et de synthèse des protéines. Une démonstration expérimentale de ce rôle reste cependant à faire.

Les résultats obtenus concernent essentiellement les dinucléotides, dont la structure préfigure celle du polymère. Une étude progressive et minutieuse d'oligonucléotides de séquences variées et connues devrait permettre une meilleure compréhension des phénomènes coopératifs dus aux interactions. Les possibilités de la synthèse chimique et enzymatique ouvrent à ces investigations un champ de recherche suffisamment vaste. Le travail sera donc poursuivi dans les directions suivantes :

1° **Étude du transfert de l'énergie d'excitation optique dans les oligo- et les polynucléotides.**

Les méthodes utilisées seront les spectrométries d'absorption et d'émission, ainsi que la résonance paramagnétique électronique. L'étude du mécanisme de tranfert d'énergie, consécutif à une absorption biphotonique, est également à faire. L'influence de l'environnement sur l'état triplet doit être précisé.

2° **Corrélation entre transfert d'énergie et etructure eecondaire dee polynucléotidee.**

Nous avons vu, en effet, que l'application de la théorie de l'exciton ou du transfert triplet-triplet pouvait permettre d'apporter des précisions sur la structure secondaire des dinucléotides. L'extension aux polynucléotides nécessite une détermination précise des taux de transfert, donc des rendements quantiques, ainsi que des temps de vie des états électroniques impliqués dans les mécanismes de transfert. Des études de polarisation des spectres d'émission sont également nécessaires.

Source : MNHN, Paris

Nous avons montré que l'appariement de la guanine et de la cytosine entraînait l'extinction de la phosphorescence de la guanine. La phosphorescence du poly *d* AT ou du poly *r* AU peut être identifiée à celle de T ou de U. La détermination du taux de phosphorescence de la guanine et de l'adénine dans un acide nucléique devrait donc permettre de préciser la proportion en simple hélice de cet acide nucléique.

3° **Conséquences photochimiques du transfert de l'énergie d'excitation optique.**

a) Le rôle de la localisation de l'énergie, à la suite du transfert, sur les réactions photochimiques « classiques « (hydratation et dimérisation des bases pyrimidiques) doit être étudié avec minutie.

b) Le transfert de proton entre bases appariées et la tautomérisation de ces bases, sous l'action des radiations ultraviolettes, nécessitent une étude expérimentale.

c) Des phénomènes photochimiques nouveaux comme la photoéjection d'électrons et la photosensibilisation de molécules telles que les acides aminés aliphatiques, doivent être étudiés d'une manière approfondie (irradiations monochromatiques, détermination des spectres d'action, irradiations intermittentes ou alternées, détermination des spectres d'absorption triplet-triplet).

Notre contribution à l'étude du rôle des interactions sur les propriétés spectroscopiques et photochimiques des constituants des acides nucléiques n'est donc que le prélude d'un travail de recherche dont le but ultime est l'étude de l'absorption des radiations ultraviolettes et de l'utilisation de l'énergie correspondante par une macromolécule comme l'acide désoxyribonucléique. Cette étude permettra d'obtenir des informations sur la nature des interactions qui assurent la stabilité de la structure secondaire du polymère et sur les conséquences photochimiques de ces interactions.

L'association des techniques et la progression dans la complexité des matériaux étudiés promettent donc d'être fructueuses pour l'étude physico-chimique des propriétés électroniques fondamentales des biomolécules.

Source : MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

BIBLIOGRAPHIE

1. — Chargaff E. Feder. Proc., **10**, 654 (1951).
2. — Wilkins M. F. H., Stokes A. R., Wilson H. R. Nature, **171**, 738 (1953).
3. — Franklin R. E., Gosling R. G. Nature, **171**, 740 (1953).
4. — Watson J. D., Crick F. H. C. Nature, **171**, 964 (1953).
5. — Colloque d'information « Aspects physico-chimiques de la biologie », Roscoff (1962).
6. — Jaffe H. H., Orchin M. " Theory and applications of ultraviolet spectroscopy ", J. Wiley and Sons (1962).
7. — McGlynn S. P., Smith F. J., Cilento G. Photochem. Photobiol., **3**, 269 (1964).
8. — Davydov A. S. " Theory of molecular excitons " (traduit du russe par M. Kasha et M. Oppenneimer), McGraw-Hill Book Company N. Y. (1962).
9. — Kasha M. Radiation research., **20**, 55 (1963).
10. — Tinoco I. J. Amer. Chem. Soc., **82**, 4785 (1960).
    J. Chem. Phys., **33**, 1332 (1960).
    J. Chem. Phys., **34**, 1067 (1961).
11. — Rhodes W. J. Amer. Chem. Soc., **83**, 3609 (1961).
12. — De Voe H., Tinoco I. J. Mol. Biol., **4**, 518 (1962).
13. — Kasha M., El-Bayoumi M. A., Rhodes W. J. Chim. Phys., **58**, 916 (1961).
14. — McRae E. G., Kasha M. J. Chem. Phys., **28**, 721 (1958).
15. — Förster T. Disc. Faraday Soc., **27**, 7 (1959).
16. — Förster T. dans " Comparative effects of radiation " J. Wiley and Sons (1960), p. 300.
17. — Terenin A., Ermolaev V. Dokl. Akad. Nauk S. S. S. R., **85**, 547 (1952). Trans. Faraday Soc., **52**, 1042 (1956).
18. — Ermolaev V. Soviet Physics Uspekhi, **80**, 33 (1963).
19. — Dexter D. L. J. Chem. Phys., **21**, 836 (1953).
20. — El-Sayed M. A., Wauk M. T., Robinson G. W. J. Mol. Phys., **5**, 205 (1962).
21. — Nieman G. C., Robinson G. W. J. Chem. Phys., **39**, 1298 (1963).
22. — Parker C. A. Proc. Roy. Soc. A., **276**, 125 (1963).

Source : MNHN, Paris

23. — Azumi T., McGlynn S. P. J. Chem. Phys., **41**, 3131 (1964).

24. — Parker C. A., Rees W. T. Analyst, **85**, 587 (1960).

25. — Michelson A. M. J. Chem. Soc., 3655 (1959).
Biochim. Biophys. Acta, **91**, 1 (1964).
" The chemistry of nucleosides and nucleotides ", Academic Press (1963).

26. — Kasha M. " Light and life ", John Hopkins Press (1961).

27. — Beaven G. H., Holiday E. R., Johnson E. A. " The nucleic acids ", volume 1, Academic Press (1955).

28. — Callis P. R., Rosa E. J., Simpson W. T. J. Amer. Chem. Soc., **86**, 2292 (1964).

29. — Voet D., Gratzer W. B., Cox R. A., Doty P. Biopolymers, **1**, 193 (1963).

30. — Stewart R. F., Davidson N. J. Chem. Phys., **39**, 255 (1963).

31. — Stewart R. F., Jensen L. H. J. Chem. Phys., **40**, 2071 (1964).

32. — Fox J. J., Shugar D. Biochim. Biophys. Acta, **9**, 369 (1952).

33. — Basu S., Greist J. H. J. Chim. Phys., **60**, 407 (1963).

34. — Basu S., Loh L. Biochim. Biophys. Acta, **76**, 131 (1963).

35. — Borresen H. C., Acta Chem. Scand., **17**, 921 (1963).

36. — Udenfried S., Zaltman P. Anal. Biochem., **3**, 49 (1962).

37. — Borresen H. C. Acta Chem. Scand., **17**, 2359 (1963).

38. — Longworth J. W. Biochem. J., **84**, 104 P (1962).

39. — Douzou P., Francq J. C., Hanss M., Ptak M. J. Chim. Phys., **58**, 926 (1961).

40. — Bersohn R., Isenberg I. Biochem. Biophys. Res. Com., **13**, 205 (1963). J. Chem. Phys., **40**, 3175 (1964).

41. — Rahn R. O., Lonoworth J. W., Eisinger J., Shulman R. G., Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **51**, 1299 (1964).

42. — Rahn R. O., Shulman R. G., Longworth J. W. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **53**, 893 (1965).

43. — Wright M. R., Frosch R. P., Robinson G. W. J. Chem. Phys., **33**, 934 (1960).

44. — Robinson G. W., Frosch R. P. J. Chem. Phys., **37**, 1962 (1962); **38**, 1187 (1963).

45. — Rich A., Davies D. R., Crick F. H. C., Watson J. D. J. Mol. Biol., **3**, 71 (1961).

46. — Richtol H. H., Klappmeier F. H. J. Amer. Chem. Soc., **86**, 1255 (1964).

47. — Bruice T. C., Butler A. R. Feder. Proc., **24**, S-45 (1965).

Source : MNHN, Paris

48. — Wang S. Y. Nature, **190**, 690 (1961).
Feder. Proc., **24**, S-71 (1965).

49. — Perrin F. Comptes rendus, **178**, 1978 (1924).

50. — Hélène C., Douzou P., Michelson A. M. Biochim. Biophys. Acta., **109**, 261 (1965).

51. — Warshaw M. M., Tinoco I. J. Mol. Biol., **13**, 54 (1965).

52. — Hèlène C., Douzou P., Michelson A. M. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A., **55**, 376 (1966).

53. — Hélène C. Biochem. Biophys. Res. Com., **22**, 237 (1966).

54. — Levinson G. L., Simpson W. T., Curtis W. J. Amer. Chem. Soc., **79**, 3414 (1957).

55. — McRae E. G., Kasha M. dans " Physical processes in radiation blology " Academic Press (1964) p. 23.

56. — Bradley D. F., Tinoco I., Woody R. W. Biopolymers, **1**, 239 (1963).

57. — Massoulié J., Michelson A. M. Comptes rendus, **259**, 2923 (1964).

58. — Van Holde K. E., Brahms J., Michelson A. M. J. Mol. Biol., **12**, 726 (1965).

59. — Warshaw M. N., Bush C. A., Tinoco I. Biochem. Biophys. Res. Com., **18**, 633 (1965).

60. — Robinson G. W. Annu. Rev. Phys. Chem., **15**, 311 (1964).

61. — El-Bayoumi A., Kasha M. J. Chem. Phys., **34**, 2181 (1961).

62. — O'Brien E. J. J. Mol. Biol., **7**, 107 (1963).

63. — Hoogsteen K. Acta Cryst., **12**, 822 (1959).
16, 907 (1963).

64. — Lipsett M. N., Heppel L. A., Bradley D. F. J. Biol. Chem., **236**, 857 (1961).

65. — Weil G., Calvin M. Biopolymers, **1**, 401 (1963).

66. — Weil G. Biopolymers, **3**, 567 (1965).

67. — Isenbero I., Leslie R. B., Baird S. L., Rosenbluth R., Bersohn R. Proc. Natl. Acad. Sci U. S. A., **52**, 379, (1964).

68. — McLaren A. D., Shuoar D. " Photochemistry of proteins and nucleic acids ", Pergamon Press (1964).

69. — Smith K. C. " Photophysiology ", vol. II, Academic Press (1964), p. 329.

70. — Johns H. E., Rapaport S. A., Delbrück M. J. Mol. Biol., **4**, 104 (1962).

71. — Sztumpf E., Shugar D. Photochem. Photobiol. **4**, 719 (1965).

72. — Hélène C., Santus R., Douzou P. Photochem. Photobiol., **5**, 127 (1966).

73. — Pullman A., Rossi M. Biochim. Biophys. Acta, **88**, 211 (1964).

Source : MNHN, Paris

74. — PULLMAN B., PULLMAN A. "Quantum Biochemistry", Interscience (1963).

75. — HÉLÈNE C., HAUG A., DELBRÜCK M., DOUZOU P. Comptes rendus, **259**, 3385 (1964).

76. — HÉLÈNE C., DOUZOU P. Comptes rendus, **258**, 196 (1964).

77. — MOORE A. M. Canad. J. Chem., **41**, 1937 (1963).

78. — HÉLÈNE C., DOUZOU P. Comptes rendus, **259**, 4387 (1964).

79. — MCCONNELL J. F., SHARMA B. D., MARSH R. E. Nature, **203**, 399 (1964).

80. — HÉLÈNE C., DOUZOU P. Comptes rendus, **259**, 4853 (1964).

81. — WIERZCHOWSKI K. L., SHUGAR D. Acta Biochim. Polon., **7**, 377 (1960).

82. — BERENDS W. J. Chim. Phys., **58**, 1032 (1961).

83. — MANTIONE M. J., PULLMAN B. Biochim. Biophys. Acta, **91**, 387 (1964).

84. — HAUG A., DOUZOU P. Z. Naturforschg., **206**, 509 (1965).

85. — SULLIVAN P. J., KOSKI W. S. J. Amer. Chem. Soc., **86**, 159 (1964).

86. — DOUZOU P., PTAK M. J. Chim. Phys., **61**, 1781 (1964).

87. — PTAK M. Thèse Paris (1965).

88. — SHIGORIN D. N., PICKUNOV A. K., OZEROVA G. A., SHCHEOLOVA N. A., VEREIN N. V. Dokl. Akad. Nauk SSSR, **158**, 432 (1964).

89. — SIEOEL S., EISENTHAL K. J. Chem. Phys., **42**, 2494 (1965).

90. — SANTUS R., GUERMONPREZ R., PTAK M. Comptes rendus, **261**, 117 (1965).

91. — AZIZOVA O. A. Biofizika, **9**, 745 (1965).

92. — LÖWDIN P. O. dans "Electronic aspects of biochemistry", Academic Press (1964), p. 167.

93. — REIN R., LADIK J. J. Chem. Phys., **40**, 2466 (1964).

94. — HART E. J., GORDON S., THOMAS J. K. J. Phys. Chem., **68**, 1271 (1964).

95. — REIN R., HARRIS F. E. J. Chem. Phys., **42**, 2177 (1965).

96. — BOYCE R., SETLOW R. Biochim. Biophys. Acta, **68**, 446 (1963).

97. — COHEN B. J., GOODMAN L. J. Amer. Chem. Soc., **87**, 5487 (1965).

Source : MNHN, Paris

TABLE DES MATIÈRES

Pages

INTRODUCTION 3

CHAPITRE I. — INFLUENCE DES INTERACTIONS SUR L'UTILISATION DE L'ÉNERGIE D'EXCITATION OPTIQUE PAR UNE MOLÉCULE ORGANIQUE. 7

A. — EXCITATION OPTIQUE D'UNE MOLÉCULE. 7

B. — DISSIPATION, SANS TRANSFERT ÉLECTRONIQUE, DE L'ÉNERGIE D'EXCITATION OPTIQUE 11

1° Par une molécule dans un état singulet excité 11

2° Par une molécule dans un état triplet 13

C. — INFLUENCE DES INTERACTIONS ENTRE CHROMOPHORES SUR LES PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES DE MOLÉCULES ORGANIQUES 14

1° En absorption : exciton - hypochromie. 14

2° En émission : transfert d'énergie. 15

D. — INFLUENCE DES INTERACTIONS SUR LES PROPRIÉTÉS PHOTOCHIMIQUES DE MOLÉCULES ORGANIQUES : CAS DES ACIDES NUCLÉIQUES. 17

CHAPITRE II. — TECHNIQUES EXPÉRIMENTALES. COMPOSÉS ÉTUDIÉS 19

CHAPITRE III. — ÉTUDE DES ÉTATS EXCITÉS DES BASES, DES NUCLÉOSIDES ET DE DÉRIVÉS SUBSTITUÉS. 29

A. — TRANSITIONS SINGULET-SINGULET : ABSORPTION-FLUORESCENCE 29

B. — ÉTUDE DE L'ÉTAT TRIPLET LE PLUS BAS : PHOSPHORESCENCE-RÉSONANCE PARAMAGNÉTIQUE ÉLECTRONIQUE. . . 38

C. — INFLUENCE DES SUBSTITUTIONS, DE L'ÉTAT PHYSIQUE ET DES INTERACTIONS AVEC LE SOLVANT. 42

D. — CONCLUSION. 48

Source : MNHN, Paris

Pages

CHAPITRE IV. — INFLUENCE DES INTERACTIONS ENTRE LES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES SUR LEURS PROPRIÉTÉS SPECTROSCOPIQUES. 53

A. — TRANSFERT D'ÉNERGIE DANS LES DI- ET TRINUCLÉOTIDES MIXTES ET DANS LES SOLUTIONS AQUEUSES CONGELÉES DE NUCLÉOSIDES 53

B. — INTERACTIONS DE TYPE EXCITONIQUE ENTRE LES BASES SUPERPOSÉES D'UN HOMO-DINUCLÉOTIDE 75

C. — INTERACTIONS ENTRE LES BASES D'UN MÊME PLATEAU . . 83

CHAPITRE V. — RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES 91

A. — RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES DES CONSTITUANTS DES ACIDES NUCLÉIQUES 91

B. — INFLUENCE DES RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES SUR LES INTERACTIONS DANS LES DINUCLÉOTIDES 100

C. — INFLUENCE DES INTERACTIONS SUR LES RÉACTIONS PHOTOCHIMIQUES : PHOTOSENSIBILISATION ET TRANSFERT DE PROTON. 101

Source : MNHN, Paris

Achevé d'imprimer le 18 juillet 1966.

Printed in France — *Le Directeur-Gérant :* Prof. Chabaud

59362. — Imp. Lahure, 9 rue de Fleurus, Paris (6e).
Dépôt légal : 2e trimestre 1966.

Source . MNHN, Paris

Source . MNHN, Paris

Source : MNHN, Paris

Les Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle paraissent sans périodicité fixe. Chaque volume est formé d'un nombre variable de fascicules, publiés isolément et ne contenant qu'un seul mémoire.

Les auteurs reçoivent 50 tirages à part de leurs travaux, brochés et sous couverture. Ils s'engagent à ne pas les mettre dans le commerce.

Les fascicules sont en vente aux *Editions du Muséum National d'Histoire naturelle*, 38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, Paris (5e).

Compte chèque postal : PARIS 9062-62.

ÉDITIONS DU MUSÉUM NATIONAL D'HISTOIRE NATURELLE

38, rue Geoffroy-Saint-Hilaire, Paris

Archives du Muséum National d'Histoire naturelle (commencées en 1802 comme *Annales du Muséum National d'Histoire naturelle*). Un volume in-4° par an.

Bulletin du Muséum National d'Histoire naturelle (commencé en 1895). Un volume in-8° par an.

Mémoires du Muséum National d'Histoire naturelle, nouvelle série (commencée en 1935). In-8°, sans périodicité fixe.

Publications du Muséum National d'Histoire naturelle (sans périodicité fixe). Paraît par fascicules in-8°.

Revue française d'Entomologie (Directeur : Dr R. Jeannel, laboratoire d'Entomologie). Paraît depuis 1934, in-8°.

Adansonia (commencées en 1909 comme *Notulae systematicae*). (Directeurs : MM. H. Humbert et A. Aubréville, laboratoire de Phanérogamie). In-8°, sans périodicité fixe.

Index seminum in Hortis Musei parisiensis collectorum (Service de Culture). Paraît depuis 1822. Echange.

Journal d'Agriculture tropicale et de Botanique appliquée. (Secrétaires : MM. J.-F. Leroy et J. Carayon). Paraît depuis 1954.

Revue Algologique (Directeurs : MM. R. Lami et P. Bourrelly, laboratoire de Cryptogamie). Paraît depuis 1924; in-8°.

Revue Bryologique et Lichénologique (Directeur : Mme Allorge, laboratoire de Cryptogamie). Paraît depuis 1874; in-8°.

Revue de Mycologie, anciennement *Annales de Cryptogamie exotique* (Directeur : M. R. Heim). Paraît depuis 1928; in-8°.

Mammalia (Directeur : M. J. Dorst, laboratoire de Mammalogie). Paraît depuis 1936; in-8°.

Bulletin du Laboratoire maritime du Muséum National d'Histoire naturelle, à Dinard (Directeur : M. R. Heim, laboratoire maritime de Dinard). Paraît depuis 1928; in-8°.

Travaux du Laboratoire de « La Jaysinia » (Directeur : M. H. Humbert, laboratoire de Phanérogamie). Paraît par fascicules in-8°.